

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y NUCLEAR



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

**EVALUACIÓN CITOGENÉTICA DEL EFECTO
RADIOPROTECTOR DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE PROPÓLEOS.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Alegría Montoro Pastor

Dirigida por:

Dr. I. I. Gumersindo Jesús Verdú Martín.

Dr. CC.BB. Joan Francesc Barquinero Estruch.

Valencia, Julio de 2006.

A mis padres,

Mis hermanos,

Y en especial a José Manuel.

Agradecimientos

A mis directores de tesis, Gumersindo Verdú y Joan Francesc Barquinero, por haber confiado en mí, haberme enseñado tanto y tener tanta paciencia.

A mi Jefe Nacho Villaescusa y mi inmediato superior Miguel Almonacid, compañeros y amigos, por sus buenas ideas y por la oportunidad que me dieron de trabajar en este campo.

De La Universidad Autònoma de Barcelona, a Lleonard Barrios y a M^a Rosa Caballín, porque desde el principio me acogieron muy bien y me enseñaron, junto con Paco todo lo que sé de dosimetría biológica.

Del Hospital Universitario la Fe, a Eduardo Ferrer que desde el principio confió en mí y en mi trabajo y siempre me ha apoyado.

De la Unidad de Genética, a Magdalena, Lourdes, Carmen, Mónica, Paki, a las técnicos y a las enfermeras, a Silves por su ayuda, a mis compañeras y amigas Elena A, Elena G, Sandra y Teresa y muy especialmente al Dr. Félix Prieto y a Chema.

Del Servicio de Protección Radiológica, a Miguel G, Manola, Marisa, M^a Carmen, Mati, Miguel, Concha, Encarna, María, a los residentes, especialmente a Víctor y Domingo y especialmente a Pilar y Noelia.

Del Servicio de Radiofísica a Pepe Pérez, por estar ahí siempre que lo he necesitado.

De la Unidad de cultivos celular a Dra. Gómez Lechón por la colaboración tan estrecha que nos prestó desde el principio y especialmente a Fany por su ayuda y amistad.

Al Departamento de Ingeniería química y Nuclear, especialmente a Lucía, Teresa y a mis compis de viaje Miguel, Silvia y Patricia. Y de la U.P.V a Alberto Yuste.

A la empresa Dietéticos Intersa, especialmente a Juan Serrano, Maribel y Esther.

Y por último, a mis padres y hermanos, Pilar, Sara, Gerardo Amparo y Hugo, por aguantarme y quererme tanto y a José Manuel por su ayuda, apoyo y amor.

Resumen

Una de las consecuencias de la interacción de las radiaciones ionizantes sobre las células es la inducción de alteraciones cromosómicas. Esta relación de causalidad ha hecho que las alteraciones cromosómicas sean consideradas como un buen indicador de exposición a dichos agentes.

Existen agentes químicos que modulan la respuesta de los tejidos frente a las radiaciones. Estos compuestos son de utilidad cuando muestran cierta selectividad, ya sea protegiendo los tejidos sanos (radioprotectores) o aumentando la sensibilidad de los tejidos a las radiaciones (radiosensibilizadores).

El propóleos es la sustancia que vamos a evaluar. El propóleos es un producto de extraordinario interés para la medicina e industria farmacéutica, al que se atribuyen diversos efectos beneficiosos para la salud. De entre las muchas propiedades del EEP (extracto etanólico de propóleos) están el ser antioxidante y secuestrador de radicales libres.

El objetivo de esta tesis es la evaluación del efecto radioprotector del propóleos. Para ello se ha obtenido un extracto etanólico de propóleos (EEP) y se han irradiado muestras de sangre periférica con distintas condiciones, a distintas dosis de radiación en ausencia y presencia de EEP y a una misma dosis de radiación, en presencia de EEP a distintas concentraciones. Para la evaluación se han analizado, utilizando técnicas citogenéticas, las alteraciones cromosómicas presentes en linfocitos en primera división mitótica. Los resultados obtenidos muestran una disminución del número de alteraciones totales tanto cuando irradiamos a una dosis y distintas

concentraciones de EEP, obteniendo una protección frente al daño radioinducido de hasta un 44%, como cuando irradiamos a distintas dosis en presencia y ausencia de una concentración conocida de EEP, obteniendo una reducción significativa de los coeficientes lineal y cuadrático de la curva de calibración obtenida.

La concentración propuesta para radioprotección sería entre 120-500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, donde obtenemos una protección máxima observada frente al daño radioinducido y no tenemos efecto citotóxico en los cultivos de linfocitos humanos no irradiados.

El efecto citotóxico se ha evaluado analizando el efecto del EEP en el ciclo de división celular, utilizando dos índices, el mitótico y el de proliferación celular. Para ambos índices el efecto citotóxico tiene lugar a partir de concentraciones iguales o superiores a 750 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Resum

Una de les conseqüències de la interacció de les radiacions ionitzants sobre les cèl·lules és la inducció d'alteracions cromosòmiques. Esta relació de causalitat ha fet que les alteracions cromosòmiques siguen considerades com un bon indicador d'exposició a tals agents. Un d'estos marcadors per a quantificar l'exposició de les poblacions a les radiacions ionitzants són les alteracions de tipus estructural.

Hi ha agents químics que modulen la resposta dels teixits enfront de les radiacions. Aquests compostos són d'utilitat quan mostren certa selectivitat, ja siga protegint els teixits sans (radioprotectors) o augmentant la sensibilitat dels teixits a les radiacions (radiosensibilitzadors).

El propóleos és la substància que avaluarem. El propóleos és un producte d'extraordinari interès per a la medicina i indústria farmacèutica, a què s'atribuïxen diversos efectes beneficiosos per a la salut. D'entre les moltes propietats de l'EEP (extracte etanòlic de propóleos) estan el ser antioxidant i segrestador de radicals lliures.

L'objectiu d'aquesta tesi és l'avaluació de l'efect radioprotector del propóleos. Per a això s'ha obtingut un extracte etanòlic de propóleos (EEP) i s'han irradiat mostres de sang perifèrica amb diferents condicions, a diferents dosis de radiació en absència i presència d'EEP i a una mateixa dosi de radiació, en presència d'EEP a distintes concentracions. Per fer l'avaluació s'han analitzat, utilitzant tècniques citogenètiques, les alteracions cromosòmiques presents en limfòcits en primera divisió mitòtica. Els resultats obtinguts mostren una disminució del nombre d'alteracions totals tant quan irradiem a una dosi i diferents concentracions d'EEP, obtenint una protecció

enfront del dany radioinduit de fins un 44%, com quan irradiem a diferents dosis en presència i absència d'una concentració coneguda d'EEP, obtenint una reducció significativa dels coeficients lineal i quadràtic de la corba de calibratge obtinguda.

La concentració proposada per a radioprotecció es entre 120-500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, on la protecció màxima observada enfront del dany radioinduit i no tenim efecte citotòxic en els cultius de limfòcits humans no irradiats.

L'efecte citotòxic s'ha avaluat analitzant l'efecte de l'EEP en el cicle de divisió cel·lular, utilitzant dos índex, el mitòtic i el de proliferació cel·lular. Per als dos índexs l'efecte citotòxic es produïx quan utilitzem concentracions d'EEP iguals o superiors a 750 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Abstract

A consequence of ionizing radiation interaction at cells is the induction of chromosomal alterations. This relation of causality involves that chromosomal alterations can be considered a good exhibition indicator to the above-mentioned agents.

Some chemical agents can modulate the tissue response to radiation. These compounds are useful when they show certain selectivity, protecting the healthy tissues (radioprotectors) or increasing the sensibility of tissues to radiations (radiosensibilizators).

An evaluation of the propolis substance is performed. Propolis is a product of extraordinary interest for both medicine and pharmaceutical industry, since it is assumed to show diverse beneficial health effects. Among many other attributes of EEP (propolis ethanolic extract), it exhibits the antioxidant and the radical free scavenger properties.

The evaluation of propolis radioprotector effect is aimed at this thesis. With this purpose, propolis ethanolic extract (EEP) has been obtained and samples of peripheral blood have been irradiated under different conditions: to both different radiation doses in EEP absence as well as presence and the same radiation dose to different EEP concentrations. To assess the evaluation, lymphocyte chromosomal alterations have been analysed in the first mitotic division using cytogenetic techniques. The obtained results show a decrease of total alterations when we radiate to a fixed dose and different EEP concentrations, obtaining a protection against radioinduced damage of up to 44 %; as well as when we radiate to different doses in presence and absence of a known EEP concentration. In both cases a

significant reduction of the linear and quadratic coefficients for the calibration curve has been obtained.

The proposed concentration for radioprotection would be among 120-500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, when a maximum protection against radioinduced damage is obtained and a cytotoxic effect in not irradiated culture of human being lymphocytes is not evidenced.

The cytotoxic effect has been evaluated analysing the EEP effect at the cellular division cycle. Two indexes have been used, the mitotic index and cell proliferation index. For both indexes the cytotoxic effect takes place from 750 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ concentrations onwards.

ÍNDICE GENERAL**Capítulo 1**

1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Preámbulo.....	3
1.2. Objetivos.....	6
1.3. Organización de la tesis	7

Capítulo 2

2. ESTADO DEL ARTE	11
2.1. Las radiaciones ionizantes.	11
2.2. Interacción de la radiación con la materia.	12
2.3. Daños en el ADN.	15
2.4. Reparación del daño radioinducido.	16
2.5. Las alteraciones cromosómicas.	18
2.5.1 <i>Inducción de alteraciones cromosómicas por las radiaciones ionizantes.</i>	18
2.5.2 <i>Tipos de alteraciones cromosómicas estructurales.</i>	20
2.5.3 <i>Técnica de tinción cromosómica.</i>	26
2.6. Interacción con otros componentes celulares.	28
2.7. Dosimetría biológica.....	29
2.8. Propóleos	32
2.8.1 <i>Radioprotectores.</i>	32
2.8.2 <i>Origen y Composición del propóleos.</i>	33
2.8.3 <i>Efecto radioprotector del propóleos.</i>	36

Capítulo 3

3. MATERIAL Y MÉTODOS	45
3.1. Elaboración de una curva de calibración dosis – respuesta. 45	
3.1.1. <i>Obtención de la muestra.</i>	45
3.1.2. <i>Consideraciones Físicas.</i>	46
3.1.3. <i>Condiciones de Cultivo</i>	48
3.1.4. <i>Análisis Citogenético</i>	52
3.1.5. <i>Análisis estadístico</i>	52
3.2. Extracto etanólico de propóleos (EEP). Extracción, evaluación de los extractos.	55
3.3. Determinación del índice mitótico e índice de proliferación celular.....	58
3.4. Estudio citogenético del efecto radioprotector del extracto etanólico de propóleos.	62

3.4.1. <i>Evaluación inicial del efecto radioprotector.</i>	62
3.4.2. <i>Influencia de la concentración del EEP.</i>	63
3.4.3. <i>Influencia de la dosis en el EEP.</i>	63

Capítulo 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
4.1. Elaboración de una curva de calibración dosis – respuesta.	67
4.2. Influencia de la variación de la concentración del EEP a una misma dosis y cálculo de la fracción máxima protegida.	79
4.2.1. <i>Evaluación inicial del efecto radioprotector del EEP.</i>	79
4.2.2. <i>Evaluación de la influencia de la concentración del EEP.</i>	83
4.3. Evaluación del efecto radioprotector del EEP a distintas dosis de radiación.	93
4.4. Índice mitótico e índice de proliferación celular	104

Capítulo 5

5. CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS.	113
5.1. Conclusiones.....	113
5.2. Líneas futuras de Investigación	116
5.3. Publicaciones y contribuciones.....	117

Capítulo 6

6. BIBLIOGRAFÍA	125
-----------------------	-----

ÍNDICE DE TABLAS**Capítulo 2**

Tabla 2.1: Composición, características y observaciones del propóleos.....	36
--	----

Capítulo 3

Tabla 3.1: Dosis absorbidas suministradas, tiempos de exposición por cada haz.....	48
--	----

Tabla 3.2: Preparados de propóleos partiendo de las cápsulas de extracto puro en polvo utilizando como solvente el metanol y el agua	56
--	----

Tabla 3.3: Preparados de propóleos partiendo de las cápsulas de extracto puro en polvo utilizando como solvente el etanol al 95%....	56
--	----

Tabla 3.4: Irradiaciones preliminares a 2 y 5 Gy y distintas concentraciones de propóleos y etanol al 95%.	62
--	----

Capítulo 4

Tabla 4.1: Resultados citogenéticos obtenidos tras irradiación a diferentes dosis de rayos γ (N: número de células; Dic, dicéntricos; Ani, anillos; Ace, acéntricos; Otros, incluye translocaciones, inversiones etc; Ctb, rotura de cromátidas, incluyendo radiales; Gaps de cromosoma y cromátida; NA: número total de alteraciones).....	67
--	----

Tabla 4.2: Para cada dosis (Gy), número de células analizadas (N), frecuencia por célula de dicéntricos (Dic), frecuencia por célula de dicéntricos más anillos (Dic + Ani), frecuencia por célula de	
---	--

acéntricos (Ace), número de alteraciones totales (NA) y su correspondiente error (SE).70

Tabla 4.3: Para cada dosis (Gy), distribución de dicéntricos (Dic) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (U).71

Tabla 4.4: Para cada dosis (Gy), distribución de dicéntricos más anillos (Dic + Ani) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (U).72

Tabla 4.5: Para cada dosis (Gy), distribución de acéntricos (Ace) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (U).73

Tabla 4.6: Valores de los coeficientes C, α y β de la función $Y = C + \alpha D + \beta D^2$, y su error estándar de la curva dosis – efecto para dicéntricos.75

Tabla 4.7: Calidad de radiación, coeficientes y valor de α/β para distintas curvas de calibración en la bibliografía.76

Tabla 4.8: Frecuencias de dicéntricos, dicéntricos más anillos y acéntricos por célula sin irradiar y tras las irradiaciones preliminares a 2 y 5 Gy. Irradiaciones llevadas a cabo en ausencia de EEP o distintas concentraciones de EEP y etanol al 95% (N: número de células analizadas y N° alt: número de alteraciones totales).82

Tabla 4.9: Resultados citogenéticos obtenidos tras irradiación a diferentes concentraciones de EEP y a una dosis de rayos gamma de 2 Gy (N: número total de células; Dic, dicéntricos; Ani, anillos; Ace,

acéntricos; Otr: otros, incluye translocaciones, inversiones etc; Ctb: rotura de cromátidas incluyendo radiales; Gaps de cromosoma y cromátida; NA: número de alteraciones totales).84

Tabla 4.10: Para cada concentración de EEP y tras irradiar a 2 Gy, distribución de dicéntricos (Dic) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (U).84

Tabla 4.11: Para cada concentración de EEP y tras irradiar a 2 Gy, distribución de dicéntricos más anillos (Dic + Ani) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (U). ..85

Tabla 4.12: Para cada concentración de EEP y tras irradiar a 2 Gy, distribución de acéntricos (Ace) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (U).85

Tabla 4.13: Para cada concentración de EEP y tras irradiar a 2 Gy, número de células analizadas (N), frecuencia (\pm error estándar) por célula de dicéntricos (Dic), frecuencia (\pm error estándar) por célula de dicéntricos más anillos (Dic + Ani), frecuencia (\pm error estándar) por célula de acéntricos (Ace) y número de alteraciones totales (NA).88

Tabla 4.14: Resultados citogenéticos obtenidos tras irradiación a diferentes dosis de rayos γ y una concentración de EEP de 1000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (N: células analizadas; Dic, dicéntricos; Ani, anillos; Ace, acéntricos; Otros, incluye translocaciones, inversiones etc; Ctb, rotura de cromátidas; NA: número de alteraciones totales).93

Tabla 4.15: Para cada dosis de irradiación y una concentración de EEP de 1000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, distribución de dicéntricos (Dic) por célula

(Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (U).94

Tabla 4.16: Para cada dosis de irradiación y una concentración de EEP de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, distribución de dicéntricos más anillos (Dic + Ani) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (U).95

Tabla 4.17: Para cada dosis de irradiación y una concentración de EEP de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, distribución de acéntricos (Ace) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (U).95

Tabla 4.18: Frecuencias de dicéntricos, dicéntricos más anillos, acéntricos y número de alteraciones totales (NA) por célula, para las muestras control y las muestras a una concentración de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, irradiadas a 0.25, 0.5, 1, 2 y 5 Gy.96

Tabla 4.19: Valores de los coeficientes C, α y β de la función $Y = C + \alpha D + \beta D^2$, y su error estándar de las curvas dosis – efecto para dicéntricos y dicéntricos más anillos tratadas con EEP.98

Tabla 4.20: Índice de proliferación celular y su correspondiente error ($\pm\text{SE}$) para distintas concentraciones de EEP (N: células analizadas; M1: metafase en primera división celular; M2: metafase en segunda división celular; M3: metafase en tercera división celular).....105

Tabla 4.21: Índice mitótico y porcentaje de inhibición, a distintas concentraciones de EEP (N: células analizadas; Núc.: núcleos; Meta.: metafases; IM: índice mitótico).....107

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 2.1: Metafase con un fragmento acéntrico.20

Figura 2.2: Metafase con una rotura de cromosoma.21

Figura 2.3: Metafase con un intercambio asimétrico tipo dicéntrico con su correspondiente acéntrico.22

Figura 2.4: Metafase con un intercambio simétrico.....22

Figura 2.5: Metafase con un intercambio asimétrico tipo inserción. 23

Figura 2.6: Metafase con un intercambio asimétrico tipo anillo.23

Figura 2.7: Metafase con un “gap” de cromosoma.....24

Figura 2.8: Metafase con un “gap” de cromátida.25

Figura 2.9: Metafase con una rotura de cromátida.....25

Figura 2.10: La figura muestra dos imágenes, la imagen a) muestra una metafase con un tetra-radial y la imagen b) una metafase con un tri-radial.....26

Figura 2.11: Metafase normal en segunda división mitótica.....27

Figura 2.12: Esquema que muestra el fundamento de la técnica Fluorescente Plus Giemsa. B= 5´bromo 2´deoxiuridina. T=timidina.

A=adenina. C=citosina. G=guanina (Barquinero *et al.*, 1991).28

Figura 2.13: Propóleos y Abeja (del género *Apis*).34

Capítulo 3

Figura 3.1: Obtención de la muestra.....46

Figura 3.2: Equipo de irradiación, THERATRON PHOENIX.46

Figura 3.3: Cubeta de irradiación.47

Figura 3.4: Extracción del cultivo; Choque hipotónico.50

Figura 3.5: Extracción del cultivo; Lavados con Carnoy.51

Figura 3.6: Secuencia de pasos de la técnica de tinción *Fluorescente Plus*51

Figura 3.7: Fotografía que muestra tres núcleos (flecha rosa) y una metafase (flecha verde) en un total de cuatro células.58

Figura 3.8: Metafases en primera (a), segunda (b) y tercera (c) división61

Capítulo 4

Figura 4.1: Metafase en primera división mitótica con un gap de cromosoma.....68

Figura 4.2: Metafase en primera división mitótica con un cromosoma dicéntrico y su correspondiente acéntrico.....68

Figura 4.3: Curva de Calibración dosis –efecto para rayos γ (dic: dicéntricos, cel: célula, obs: observado, esp: esperado y SE: error estándar).....78

Figura 4.4: Gráfica que representa la frecuencia de dicéntricos por célula a la dosis de 2 Gy y distintas concentraciones de EEP.....89

Figura 4.5: Gráfica que representa la frecuencia de dicéntricos más anillos por célula a la dosis de 2 Gy y distintas concentraciones de EEP.....90

Figura 4.6: Curvas dosis – efecto para rayos gamma con EEP (1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y sin EEP de las frecuencias observadas y esperadas de dicéntricos, su correspondiente error y los límites al 95%.100

Figura 4.7: Curvas dosis – efecto para rayos gamma con EEP (1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y sin EEP, de las frecuencias observadas y esperadas de dicéntricos más anillos, su correspondiente error y los límites al 95%101

Figura 4.8: Índice de proliferación celular (IP) a distintas concentraciones de EEP sin irradiar.106

Figura 4.9: Índice mitótico de las distintas concentraciones de EEP sin irradiar.108

Figura 4.10: Correlación entre el índice de proliferación y la inhibición del índice mitótico, a distintas concentraciones de EEP, sin irradiar.110

Capítulo 1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Preámbulo

Las radiaciones ionizantes son ampliamente utilizadas en diversos ámbitos, tanto en el campo de la medicina, para el diagnóstico de enfermedades o lesiones y para el tratamiento de las mismas; como en la industria, especialmente con fines de análisis y de control de procesos, con usos en la alimentación y la agricultura, para estudios de alimentación agrícola, eficacia de fertilizantes, eficacia de los sistemas de riesgos, intercomunicación de acuíferos, etc. En el ámbito de la investigación y docencia, para investigaciones físicas, químicas y biológicas, y por último otros usos de las radiaciones ionizantes en el mundo de la geofísica, geoquímica y estudios medioambientales.

Las radiaciones ionizantes aún siendo necesarias se ha comprobado que también son perjudiciales para la salud, ya desde prácticamente su descubrimiento en 1905 por Henry Becquerel la ciencia también se dedica a la protección frente a ellas. De hecho este interés por la protección ha dado lugar a una disciplina dentro de la física médica que es la protección radiológica. La protección radiológica se ocupa de la protección frente a las radiaciones ionizantes, utilizando blindajes físicos, y químicos.

La interacción de la radiación ionizante con la materia viva puede producir efectos directos por la interacción de la radiación ionizantes con moléculas importantes para la célula, como el ADN, o efectos indirectos debidos a la interacción de la radiación con una molécula intermedia, fundamentalmente la molécula intermedia es el agua. La protección frente a este daño se puede conseguir evitando que se

produzcan los efectos debidos a la acción directa o mediante el secuestro de radicales libres producidos por el efecto indirecto de la radiación.

Los radioprotectores más conocidos son los compuestos sulfidrilos, como la cisteína y la cisteamina; tienen actividad secuestradora de radicales libres y facilitan la reparación química del ADN. Cabe señalar que estos radioprotectores son tóxicos a las dosis que se requerirían para ser efectivos. Además de estos radioprotectores, el único aprobado por la FDA (Food and Drug Administration, USA) es la amifostina. Este radioprotector está indicado en radio y quimioterapia para la protección de pacientes con tumores sólidos. Dentro de las sustancias protectoras frente al daño producido por las radiaciones ionizantes, se encuentran los agentes antioxidantes como las vitaminas, el glutatión y compuestos con grupos alcohol. Por esta razón es importante la búsqueda de radioprotectores químicos que no tengan efectos adversos y que presenten una toxicidad mínima o reversible.

La constitución cromosómica de los individuos de una misma especie es constante en cuanto a la morfología y el número de cromosomas. Sin embargo, pueden producirse variaciones cromosómicas, espontáneas o inducidas, que pueden afectar tanto a su estructura como a su número. Estas variaciones constituyen las alteraciones cromosómicas. El daño inducido por las radiaciones al ADN, puede ser reparado por los mecanismos de reparación de la célula, pero si no se repara o se repara de forma incorrecta, puede dar lugar a las alteraciones cromosómicas. La variación de la frecuencia de las alteraciones cromosómicas en función de la dosis, se denomina curva dosis-respuesta. Las curvas de calibración y las técnicas

citogenéticas utilizadas para realizar estudios de Dosimetría biológica se pueden utilizar para testar el efecto radioprotector de sustancias utilizando cultivos *in vitro*.

En este contexto y tras el planteamiento por parte de la empresa Dietéticos Intersa de la posibilidad de evaluar el efecto radioprotector del propóleo, surge esta tesis doctoral.

Existen muchos radioprotectores naturales y los mecanismos para llevar a cabo esta protección son también muy diversos. El propóleo es el nombre genérico de la sustancia resinosa recolectada y transformada por las abejas de fuentes de plantas diferentes y que se utiliza en la construcción, reparación y protección de la colmena. En este estudio utilizamos un extracto de propóleo, la manera usual de extraer la fracción soluble es con alcohol (EEP, extracto etanólico de propóleo).

De todas las propiedades del propóleo (anti-inflamatorio, inmunestimulante, hepatoprotector, antiviral, anti-fúngico, anti-protozoario, carcinoestático, anti-microbiano, anestésico y de regeneración tisular) en la presente tesis nos centraremos en la habilidad que posee el propóleo de proteger frente a las radiaciones ionizantes.

Esta tesis doctoral es uno de los primeros trabajos basados en estudios citogenéticos del propóleo.

1.2 Objetivos.

El objetivo general de esta tesis es la evaluación del efecto radioprotector del propóleos. Para ello se irradiarán linfocitos humanos con distintas condiciones, y se evaluará el efecto radioprotector frente a la producción de alteraciones cromosómicas.

Este propósito se aborda desde una serie de objetivos concretos, que son:

1. Obtención de una curva control dosis-efecto mediante el análisis de alteraciones cromosómicas. La obtención de una curva de calibración dosis-efecto para rayos gamma, es un punto de referencia para establecer un laboratorio de Dosimetría Biológica.
2. Obtención de un extracto etanólico de propóleos, que sea utilizable para realizar estudios citogenéticos.
3. Evaluación del efecto radioprotector del extracto etanólico de propóleos:

3.1 Análisis dependiente de concentración:

- Para una misma dosis de radiación se evalúa el efecto en las distintas alteraciones cromosómicas con el incremento de la concentración de EEP.

3.2 Análisis dependiente de dosis de radiación:

- Efecto de la irradiación a distintas dosis de radiación, en ausencia y presencia de EEP, en las distintas alteraciones cromosómicas analizadas.
- Comparación de los coeficientes lineal y cuadrático de las curvas de calibración obtenidas en presencia y ausencia de EEP.

4. Evaluación del efecto citotóxico del propóleo mediante el análisis del índice mitótico y el índice de proliferación celular.

1.3 Organización de la tesis.

La tesis se estructura en seis capítulos, siendo la distribución de los contenidos la siguiente:

El **Capítulo 1** razona el motivo que indujo a la realización de este estudio y sus objetivos generales y específicos.

En el **Capítulo 2** se realiza un análisis de la realidad actual del conocimiento de la ciencia en referencia a los efectos biológicos de la radiación ionizante. El siguiente punto de este capítulo se centra en explicar que es la dosimetría biológica, para que sirve y cuales son sus aplicaciones. En el último punto se hace una revisión del propóleo, su origen y composición y el efecto radioprotector de éste.

En el **Capítulo 3** se describe el material y metodología para llevar a cabo las curvas de calibración dosis-respuesta, la extracción del propóleo y los estudios preliminares del efecto radioprotector y

como determinamos los índices mitótico y de proliferación para conocer el efecto del propóleos en el ciclo de división celular.

En el **Capítulo 4** se abordan los resultados y discusión, en primer lugar de la curva de calibración control, en segundo lugar los resultados relacionados con la influencia de la concentración de propóleos a una misma dosis de radiación. Los siguientes apartados hacen referencia a los resultados del efecto radioprotector del propóleos a distintas dosis de radiación y por último el conocimiento del índice mitótico y de proliferación.

El **Capítulo 5** recoge las conclusiones de los diferentes estudios abordados en esta tesis y plantea futuras líneas de investigación.

Por último, en el **Capítulo 6** se realiza una recopilación de la diferente bibliografía que hemos utilizado para la realización de este estudio de investigación.

Capítulo 2. Estado del arte

2. ESTADO DEL ARTE

2. 1. Las radiaciones ionizantes.

La radiación ionizante es aquella que tiene energía suficiente para provocar fenómenos de excitación e ionización de los átomos y las moléculas que atraviesa. Existen diferentes tipos de radiaciones ionizantes que se clasifican en:

Ondas electromagnéticas: liberan energía que se transmite en forma de fotón; rayos X y γ .

Radiaciones corpusculares: liberan energía que se transmite en forma de partículas energéticas con masa, ya sea con carga, como las partículas α o las β , o sin carga, como los neutrones.

Los efectos que producen las radiaciones ionizantes dependen de ciertas variables físicas:

La dosis absorbida, se define como la energía media depositada por la radiación por unidad de masa del medio considerado y en un punto determinado del mismo. La unidad en el Sistema Internacional es el Gray (Gy) que equivale a la absorción de un Julio de energía por un Kg de masa.

La transferencia lineal de energía (TLE), se define como la densidad de energía absorbida por el medio por unidad de longitud de la trayectoria, se expresa en KeV/ μ m. Una misma dosis absorbida de diferentes tipos de radiaciones, no tiene porqué producir el mismo efecto biológico, debido a que la energía se puede depositar de manera diferente a lo largo de la trayectoria. Podemos caracterizar

los distintos tipos de radiación ionizante por su TLE. La radiación de baja TLE es conocida como una radiación débilmente ionizante, que produce pocas ionizaciones por recorrido y que se distribuye de manera uniforme a lo largo de la trayectoria. Por otro lado las radiaciones con un número de ionizaciones por unidad de longitud elevada, son conocidas como radiaciones de “alta TLE”, donde la energía no se distribuye uniformemente (ej. Partículas alfa, protones y núcleos de retroceso por interacción de neutrones o iones pesados).

2. 2. Interacción de la radiación con la materia.

En la interacción de la radiación ionizante con la materia viva se suceden *una fase física*, en la que se produce absorción de energía: ionizaciones y excitaciones; *una fase química*, con la formación de radicales libres; y *una fase molecular o bioquímica*, con la aparición de moléculas y macromoléculas anormales.

La interacción física entre la radiación ionizante y los átomos de la materia viva, es un fenómeno aleatorio de carácter probabilístico.

La absorción de energía produce ionizaciones y excitaciones en los átomos de las moléculas donde se ha producido la interacción. Que se produzca uno u otro proceso dependerá de la cantidad de energía absorbida.

El proceso de ionización tiene lugar cuando en la interacción de la radiación con los electrones atómicos constituyentes de la materia, la energía transferida es superior a la “energía de enlace” (energía de ionización) de estos electrones. Esto provoca el abandono del átomo por parte del electrón creando un ión positivo.

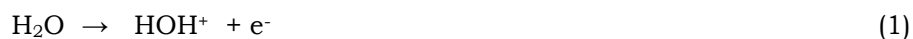
El proceso de excitación tiene lugar cuando en la interacción de la radiación incidente con un electrón atómico, la energía transferida es insuficiente para producir ionización, el electrón impactado no abandona el átomo, pero sí puede cambiarse a una órbita de mayor energía. Tal electrón excitado devolverá la energía en forma de radiación electromagnética, en las llamadas transiciones radiactivas, o bien degradándose a calor, en las transiciones no radiactivas.

La radiación ionizante puede producir efectos de forma directa o indirecta sobre la materia viva. El efecto directo tiene lugar cuando la interacción de la radiación se produce con una macromolécula biológica (ej.: ADN), mientras que el efecto indirecto, implica la absorción de la radiación ionizante por una molécula intermedia, la producción de radicales libres y la interacción de éstos con la macromolécula biológica. La molécula intermedia que interviene fundamentalmente en la acción indirecta es el agua (H₂O).

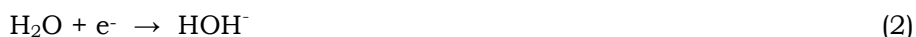
El resultado de la interacción con el agua es la producción de tres radicales libres y dos productos moleculares:

H₂O (agua) → e⁻_{aq} (electrones acuosos), H[·] (radical hidrógeno), OH[·] (hidroxilo) , H₂, H₂O₂ (peróxido de hidrógeno).

Cuando la radiación interacciona con una molécula de agua, esta se ioniza produciendo una pareja iónica de un ión HOH⁺ y un electrón (e⁻) (1):



Este electrón puede unirse con el ión HOH⁺, y/o interactuar con otras moléculas de agua, con lo que se forma otro ión, que en este caso es negativo (2).

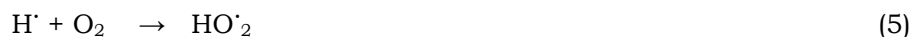


Los iones HOH⁺ y HOH⁻ son muy inestables y se descomponen con facilidad (3 y 4) siempre que en el medio estén presentes moléculas de agua no ionizadas, con la consiguiente formación de otros iones y radicales libres:



Los iones H⁺ y OH⁻ pueden combinarse y producir una nueva molécula de agua o reaccionar químicamente y afectar a las moléculas presentes. La probabilidad de que se recombinen es superior a la de que reaccionen y produzcan un daño celular. No obstante, su alta reactividad y movilidad en el medio hace que su acción se propague a través de éste, pudiendo provocar lesiones en lugares distantes de su origen. También la unión de radicales entre sí puede provocar otro tipo de moléculas tóxicas para la célula como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

El radical libre H[·] puede combinarse con oxígeno (5), creando radicales hidroxiperoxil que pueden causar daño biológico directamente o unirse a otro hidroxiperoxil y formar peróxido de hidrógeno y oxígeno (6). El peróxido de hidrógeno también se puede formar por la unión de 2 radicales hidroxil (7) (Dowd and Wilson, 1999).



El HOH⁺ inicial también puede actuar con otra molécula de HOH⁺ creando un radical hidroxil y el H₃O⁺ (protones hidratados) (8).



2. 3. Daños en el ADN.

De todas las biomoléculas con las que pueden interaccionar las radiaciones, la más importante es el ADN al ser éste el encargado de transmitir la información genética de una célula a su descendencia. El daño puede impedir la supervivencia o la reproducción de la célula. Este daño puede ser, reparado, pero si esta reparación no es eficiente, puede dar lugar a una célula modificada con capacidad proliferante.

Las radiaciones pueden provocar diferentes tipos de daño en el ADN, que se pueden clasificar en cinco grupos:

- SSB, del inglés *single strand break*: rotura de una de las dos cadenas del ADN.
- DSB, del inglés *double strand break*: rotura de las dos cadenas del ADN.
- Daños en bases.
- Uniones ADN-proteína.
- Uniones ADN-ADN.

Las diferentes radiaciones ionizantes inducen los mismos tipos de lesiones en el ADN, pero las proporciones de cada una dependen, básicamente, de la TLE de la radiación. Para las radiaciones de baja TLE las lesiones predominantes son los daños de base y los SSB, con una proporción de aproximadamente 1 DSB por cada 10-20 SSB. Las radiaciones de alta TLE inducen una proporción más alta de DSB (Upton *et al.*, 1982, Ward *et al.*, 1995).

2. 4. Reparación del daño radioinducido.

Los diferentes tipos de lesiones del ADN se pueden reparar por diferentes mecanismos, siendo los daños de base y los SSB las lesiones de más fácil reparación. Las roturas que afectan a las dos cadenas de ADN (DSB) son las lesiones más difíciles de reparar, por eso, aunque se pueden producir en menor proporción, son las lesiones con más efecto citotóxico (Natarajan y Obe, 1983).

Los daños de base son reparados por los mecanismos de escisión de bases (BER, base excision repair), que eliminan la base dañada sustituyéndola por un nucleótido correcto. Cuando el resultado es el reemplazamiento de una única base, el mecanismo se denomina single nucleotide-BER, mientras que en los casos en que comporta la incorporación de más de un nucleótido (generalmente de 2 a 13) se denomina long path-BER. Las roturas de una sola cadena de ADN (SSB) son también fácilmente reparadas mediante mecanismos que utilizan la cadena complementaria, no lesionada, como un molde, consiguiendo mantener una alta fidelidad (Shchervakova *et al.*, 2003).

La reparación de los DSB se lleva a cabo mediante dos tipos de mecanismos diferentes:

- Mecanismos de reparación, con alta fidelidad, basados en la recombinación homóloga entre cromátidas hermanas. Estos mecanismos, llamados HRR (*Homologous Recombination Repair*), restituyen la secuencia original del ADN donde se ha producido el DSB utilizando la cromátida hermana no dañada como un molde para sintetizar de nuevo los fragmentos perdidos en la cromátida rota (Shiloh, 2003). La alta fidelidad que caracteriza este proceso hace que raramente produzca mutaciones, y por eso a menudo se le llama reparación “libre de errores” (Shcherbakova *et al.*, 2003).
- Mecanismos de reparación rápida, llamados NHEJ (*Non-Homologous End-Joining*), con tendencia a producir errores. Son mecanismos que no dependen de la homología y unen directamente los dos extremos rotos, pudiendo crear microdelecciones en el punto donde se ha producido el DSB. La desventaja de la baja fidelidad en la reparación se ve compensada por la rápida actuación y, además, a diferencia de los HRR, no dependen de la presencia de moléculas de ADN homólogas, que se encuentran en la célula sólo después de la replicación del ADN (Shiloh, 2003).

Estos mecanismos son complementarios ya que no actúan durante las mismas fases del ciclo celular. El NHEJ actúa principalmente durante la fase G₀, G₁ y al principio de la fase S, mientras que el HRR lo hace sobretodo después de la replicación del ADN, en la fase G₂. Ambos tipos de mecanismos pueden inducir la formación de alteraciones cromosómicas (Takata *et al.*, 1998). En las células de mamíferos los mecanismos de NHEJ son predominantes frente a los HRR (Shiloh, 2003).

El daño inducido por las radiaciones al ADN puede ser reparado por los mecanismos de reparación de la célula, pero si no se repara o se repara de forma incorrecta, puede dar lugar a alteraciones cromosómicas.

2. 5. Las alteraciones cromosómicas.

La constitución cromosómica de los individuos de una especie o de las células de un individuo es constante en cuanto a la morfología y número de cromosomas. Sin embargo, pueden producirse variaciones cromosómicas que pueden afectar tanto a su estructura (clastogénicas) como a su número (aneugénicas). Estas variaciones constituyen las alteraciones cromosómicas (ACs). Las ACs se pueden inducir también tras la exposición a agentes mutagénicos.

1.5.1 Inducción de alteraciones cromosómicas por las radiaciones ionizantes.

Para explicar la formación de alteraciones cromosómicas, históricamente se han considerado dos hipótesis principales:

- La Teoría de la rotura y reunión o “Breakage First”, propuesta por Sax (1938, 1941), también llamada Teoría Clásica.

Estudiando el efecto de las radiaciones en *Tradescantia*, Sax (1938) propuso la teoría de la rotura y reunión sobre la formación de alteraciones cromosómicas, de la que Lea y Catchside (1942) desarrollaron el modelo matemático. Esta teoría propone que cuando la radiación induce una rotura en el ADN, este tiene tres posibilidades:

1. La rotura se repara correctamente y se restituye la configuración inicial del cromosoma. Según esta teoría, esto sucede en más del 90% de los casos.
 2. Si se produce una segunda rotura próxima a la primera en el espacio y tiempo, los extremos se pueden reunir erróneamente mediante un mecanismo que no requiere la homología de los extremos, dando lugar a intercambios cromosómicos.
 3. La rotura se mantiene sin repararse y se manifiesta como una delección terminal.
- La Teoría del Intercambio o la Recombinación de Homólogos, propuesta por Revell (1955).

La Teoría del Intercambio, también llamada “One-hit”, como alternativa a la Teoría Clásica, postula que las radiaciones ionizantes no inducen roturas, sino lesiones inestables en la estructura del ADN. Estas pueden estabilizarse y, por lo tanto, no se generan roturas visibles, o bien pueden interactuar con secuencias de ADN homólogas no dañadas, dando lugar a un proceso de intercambio. En la Teoría “One-hit” las roturas son secundarias, y son el resultado de un fallo parcial del proceso de intercambio. Este modelo parece especialmente adecuado para explicar las alteraciones de tipo cromátida, aunque se extendió después para alteraciones de tipo cromosómico.

A finales de los años 70, al tenerse en cuenta la complejidad de los cromosomas, la arquitectura intranuclear y los mecanismos moleculares implicados en el mantenimiento y reparación, surge la Teoría molecular. Esta teoría, introducida por Chadwick y Leenhouts (1978), postula que tanto la rotura como los intercambios se

originarían a partir de un único DSB, pero que pueden actuar dos mecanismos de reparación diferentes, y en función de quien lo haga dará lugar a roturas, o bien a intercambios.

Actualmente las tres teorías son aceptadas, aunque la que recibe más apoyo para explicar la formación de alteraciones de tipo cromosoma es la Teoría Clásica (Sachs *et al.*, 2000).

2.5.2 Tipos de alteraciones cromosómicas estructurales.

Las alteraciones cromosómicas observadas las clasificamos en las de tipo cromosoma y tipo cromátida.

Alteraciones tipo cromosoma:

- Delecciones terminales e intersticiales.

- Fragmentos acéntricos:

Son alteraciones en las cuales la metafase presenta un fragmento acéntrico. Debido a que es difícil distinguir entre delecciones terminales e intersticiales, se clasifican conjuntamente como fragmentos acéntricos.



Figura 2.1: Metafase con un fragmento acéntrico.

- Rotura de cromosoma (csb):

Para clasificar una deleción como rotura de cromosoma se debe cumplir que las dos cromátidas del fragmento estén separadas y sigan una dirección diferente a las de las cromátidas del cromosoma roto.



Figura 2.2: Metafase con una rotura de cromosoma.

- Alteraciones inter cromosómicas.

- Intercambios asimétricos: dicéntrico (dic):

Un dicéntrico se puede producir por la rotura de dos cromosomas y posterior translocación de estos. Un dicéntrico analizado en la primera metafase estará acompañado de uno o dos fragmentos acéntricos. También son intercambios asimétricos los cromosomas tricéntricos y tetracéntricos. En este caso se pueden producir por la rotura y posterior reorganización de 3 ó 4 cromosomas, respectivamente (Benison *et al.*, 1986).



Figura 2.3: Metafase con un intercambio asimétrico tipo dicéntrico con su correspondiente acéntrico.

- Intercambios simétricos: translocaciones recíprocas (otros).

Las translocaciones se producen cuando un fragmento de un cromosoma, que no contiene el centrómero, es translocado a otro cromosoma y un fragmento de éste es translocado al primero. Los intercambios simétricos son particularmente difíciles de observar en preparaciones teñidas uniformemente, a no ser que los intercambios produzcan cromosomas morfológicamente diferentes de los de un cariotipo normal.

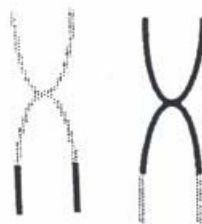


Figura 2.4: Metafase con un intercambio simétrico.

- Intercambios asimétricos inserciones (otros):

Las inserciones se producen cuando un fragmento acéntrico de un cromosoma se inserta en un brazo de otro cromosoma. Son particularmente difíciles de observar en preparaciones teñidas uniformemente, a no ser que los intercambios produzcan cromosomas morfológicamente diferentes de los de un cariotipo normal.

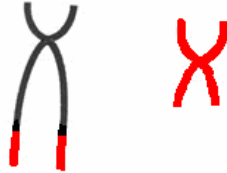


Figura 2.5: Metafase con un intercambio asimétrico tipo inserción.

- Alteraciones intracromosómicas:

- Intracambios asimétricos: acéntrico + anillo:

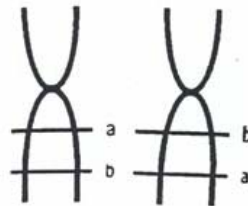
Un anillo se produce al romperse los dos brazos del mismo cromosoma y la posterior unión de estos brazos y se acompaña por uno o dos fragmentos acéntricos.



Figura 2.6: Metafase con un intercambio asimétrico tipo anillo.

- Intracambios simétricos: inversiones (otros).

Se dividen en inversiones pericéntricas y paracéntricas, según se implique la zona centromérica o no, son difíciles de observar en preparaciones teñidas uniformemente.



- Lesiones acromáticas o “gaps” de cromosoma (csg):

Estas lesiones son regiones del cromosoma muy poco o nada teñidas, presentes en las dos cromátidas hermanas en el mismo nivel. La apariencia bandeada que pueden presentar ciertas metafases hace muy difícil establecer un criterio para diferenciarlas claramente. El criterio utilizado es observar el resto de cromosomas de la metafase: si también presentan una apariencia bandeada, se descarta la anomalía; si, por el contrario es el cromosoma dudoso el único que presenta una zona poco teñida se contabiliza la alteración.



Figura 2.7: Metafase con un “gap” de cromosoma.

Alteraciones tipo cromatídico:

- Lesiones acromáticas o “gaps” de cromátida (ctg):

Los “gaps” de cromátida son regiones del cromosoma no teñidas o teñidas muy ligeramente, presentes en una cromátida. Se utiliza el mismo criterio que para los csg.



Figura 2.8: Metafase con un “gap” de cromátida.

- Rotura de cromátida (ctb):

Las ctb son el resultado de roturas de una sola cromátida del cromosoma, observándose el fragmento de cromátida asociado al cromosoma. Para diferenciar los ctb de los “gap”, el desplazamiento de la región no teñida tiene que ser más ancho que el ancho de una cromátida.



Figura 2.9: Metafase con una rotura de cromátida.

- Radiales

Son alteraciones producidas por la rotura de una cromátida de dos cromosomas diferentes y posterior intercambio o intracambio de fragmentos. El intercambio puede ser tanto simétrico como asimétrico.



Figura 2.10: La figura muestra dos imágenes, la imagen a) muestra una metafase con un tetra-radial y la imagen b) una metafase con un tri-radial.

2.5.3 Técnica de tinción cromosómica.

Para el estudio de las alteraciones cromosómicas inducidas por las radiaciones ionizantes la técnica que clásicamente se ha utilizado es la tinción uniforme. Cabe indicar que, al irradiar linfocitos en fase G_0 (reposo) del ciclo celular, las alteraciones cromosómicas que se pueden observar fácilmente en este tipo de tinción son: cromosomas dicéntricos, anillos, fragmentos acéntricos, etc. Este tipo de anomalías son mitóticamente inestables, por lo que su frecuencia tiende a disminuir a lo largo de las sucesivas divisiones celulares.

Si la frecuencia de estos tipos de alteraciones cromosómicas, se obtuviese indistintamente del análisis de metafases que han sufrido uno o más ciclos celulares durante el cultivo, la frecuencia de dicéntricos que se obtendría infravaloraría la frecuencia inicial de dicéntricos. Es por esta razón que para evaluar el efecto citogenético de las radiaciones ionizantes mediante técnicas de tinción uniforme se utiliza como técnica la tinción “*Fluorescente Plus Giemsa*” (Perry y Wolff *et al.*, 1975).

Esta técnica nos permite diferenciar durante el análisis, metafases que se encuentran en su primera división celular, de metafases que se encuentran en divisiones posteriores (Figura 2.11).



Figura 2.11: Metafase normal en segunda división mitótica celular.

Para ello al inicio del cultivo celular se le añade Bromodeoxiuridina (BrdU). La BrdU es un análogo de la timidina, que se incorpora en el lugar de ésta durante la replicación del ADN. Si la BrdU se encuentra presente durante dos ciclos celulares, una cromátida tendrá BrdU en una de sus dos cadenas polinucleótidas y la cromátida hermana tendrá BrdU en las dos cadenas. Esta incorporación de la BrdU junto

con la tinción con el colorante Hoechst (33258), que se une a la molécula de ADN en los pares de bases A+T, permite diferenciar cromátidas en las que aún hay timidina, de las cromátidas en las que en las dos cadenas la timidina esta sustituida por BrdU (Figura 2.12).

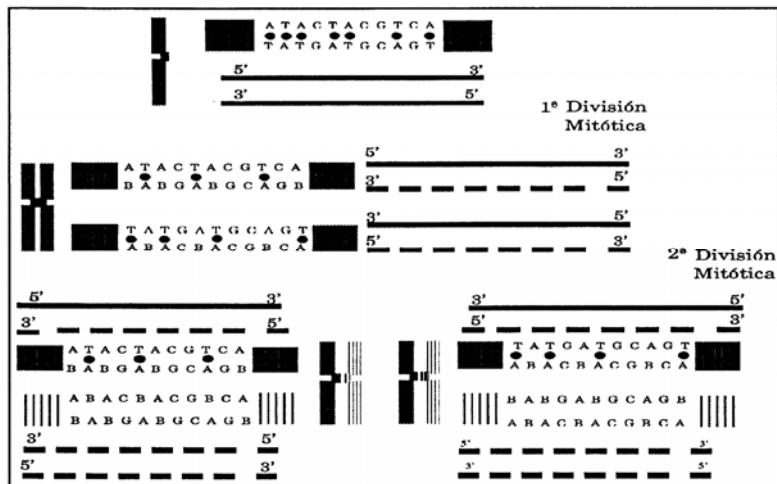


Figura 2.12: Esquema que muestra el fundamento de la técnica Fluorescente Plus Giemsa. B= 5´bromo 2´deoxiuridina. T=timidina. A=adenina. C=citosina. G=guanina (Barquinero *et al.*, 1991).

2. 6. Interacción con otros componentes celulares.

A pesar de que la molécula de ADN es considerada como el blanco principal de las radiaciones por las importantes consecuencias biológicas que pueden derivarse de la interacción, la acción de las partículas ionizantes con otras estructuras celulares posee una relevancia a menudo no contemplada. Una de las moléculas con las que interaccionan las radiaciones ionizantes son las proteínas. La principal consecuencia de la interacción radiación-proteína es la

desnaturalización de ésta última. Este proceso consiste en una alteración de la estructura nativa (más estable) de la proteína modificando su funcionalidad con respecto al transporte, catálisis, regulación del metabolismo y soporte estructural de la célula. Si el proceso de desnaturalización es suave, al desaparecer el estrés se puede restaurar la conformación nativa por un proceso de renaturalización.

Las membranas biológicas son también consideradas como dianas críticas de la radiación. Se ha postulado la posibilidad de que el daño sufrido por éstas tras la exposición a dosis elevadas de radiación sea uno de los puntos de inicio de procesos de muerte celular. Los radicales libres generados en el citoplasma, o fuera de él, provocan peroxidación de los lípidos que constituyen la membrana. La formación de peróxidos en la membrana da lugar a cambios estructurales que afectan a la permeabilidad y a los procesos de transporte activo. La presencia de radicales libres oxidantes también puede causar hiperpolarización en la membrana por activación inadecuada de los canales de sodio-potasio.

2. 7. Dosimetría biológica.

La relación de causalidad existente entre la formación de alteraciones cromosómicas y la exposición a las radiaciones ionizantes ha hecho que las alteraciones cromosómicas, particularmente los cromosomas dicéntricos se hayan considerado como un buen indicador de exposición. El recuento de cromosomas dicéntricos presentes en linfocitos de sangre periférica, se utiliza para cuantificar la dosis de una posible sobreexposición desde los años 60 (Sasaki *et al.*, 1968, Lloyd *et al.*, 1975).

Las células escogidas para realizar el análisis citogenético son los linfocitos de sangre periférica. Los linfocitos están ampliamente dispersos en los diversos tejidos y órganos. Los linfocitos son una línea celular con radiosensibilidad alta. Las características más importantes que cabe destacar de este tipo celular son:

- Núcleo denso y pequeño citoplasma, con un nucleolo que indica bajo nivel de síntesis de ARN, pocas mitocondrias, pequeño aparato de Golgi, los ribosomas están localizados en la membrana nuclear y libres en el citoplasma.
- Se distinguen dos tipos celulares, T y B. Son los linfocitos T, mayormente los subtipos CD4 y CD8, los que son estimulados *in vitro* con fitohemaglutinina y son los utilizados para dosimetría biológica.
- Se ha estimado que del número total de linfocitos en un adulto sano, solo un 2% de estos está presente en sangre periférica, el resto se encuentra localizado generalmente en otros tejidos (timo, nódulos linfáticos, amígdalas, tejidos linfáticos del intestino, bazo y médula).

Se trata de una población homogénea en lo referente a su ciclo celular. La mayoría de los linfocitos periféricos se hallan en un periodo de descanso del ciclo celular (Go), en el cual la actividad bioquímica y fisiológica son mínimas. Nowell publicó en 1960 que la fitohemaglutinina (PHA), estimula las divisiones de linfocitos, facilitando los estudios de citogenética. La visualización de los cromosomas al microscopio óptico sólo es posible cuando el material genético se encuentra en la fase del ciclo celular denominada metafase.

Se denomina curva dosis-respuesta a la variación de la frecuencia de alteraciones cromosómicas en función de la dosis. Esta relación dosis-respuesta en el caso de los dicéntricos sigue una relación lineal-cuadrática.

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2 \quad (\text{Lea y Catcheside, 1942})$$

donde “Y” la frecuencia de dicéntricos por célula a una dosis “D”, “C” la frecuencia espontánea de dicéntricos, “ α ” el factor lineal y “ β ” el factor cuadrático.

La frecuencia de dicéntricos depende, de la dosis, de la tasa de dosis y la TLE de la radiación (Lloyd *et al.*, 1975). Según la Teoría clásica (Sax, 1938) para formar un cromosoma dicéntrico es necesario un mínimo de dos roturas, en dos cromosomas. Las dos roturas pueden estar producidas por una o dos trayectorias de radiación. En el primer caso, el número de dicéntricos inducidos será proporcional a la dosis, y estará representado por el factor lineal, αD . El número de dicéntricos inducidos por dos trayectorias estará representado por el factor cuadrático, βD^2 . Para las radiaciones de baja TLE, a medida que aumenta la tasa de dosis, el factor βD^2 adquiere importancia. Para las radiaciones de alta TLE predomina el componente lineal αD , y el coeficiente β tiende a cero. Así, para radiaciones de alta TLE, la relación entre la dosis y la frecuencia de dicéntricos es una función lineal (Preston, 1990).

2.8. Propóleos.

2.8.1 Radioprotectores.

Existen agentes químicos que modulan la respuesta biológica frente a las radiaciones, ya sea protegiendo los tejidos (radioprotectores) o aumentando la sensibilidad de los tejidos a las radiaciones (radiosensibilizadores).

Los radioprotectores mejor conocidos son los compuestos sulfidrilos, como la cisteamina y cisteína. Estas sustancias contienen un grupo tiol (-SH), de manera que son buenos donantes de átomos de hidrógeno. Esta característica explica su efecto citoprotector: tienen actividad “secuestradora” de radicales libres (se unen impidiendo que reaccionen con otras moléculas) y facilitan la reparación química del ADN dañado (Spencer and Goa, 1995). Cabe señalar que tanto la cisteína como la cisteamina, sin embargo son tóxicos a las dosis que se requerirían para ser efectivos.

A finales de los años 50 el instituto de investigación “Walter Reed Army” sintetizó y analizó unos 4000 compuestos en un intento de encontrar un radioprotector útil y que no tuviese efectos secundarios. El compuesto más efectivo fue el WR-2721, cuyo nombre común es amifostina. Dentro de las sustancias protectoras, también se encuentran los agentes antioxidantes como las vitaminas C y E y el glutatión (Elsendoorn *et al.*, 2001). Otro grupo de compuestos que tienen actividad radioprotectora son compuestos con grupos alcohol (etanol, metanol, isopropanol, etc. (Sasaki *et al.*, 1977)).

Existen sustancias de origen natural que poseen una serie de actividades biológicas para protegerse de la radiación, de entre las actividades más importantes están la anti-inflamatoria, la anti-oxidante, la estimuladora del sistema hematopoyético, la inmunestimulante, la anti-microbiana, la quelante de metales, la de cicatrización y frente a la émesis inducida (náuseas y vómitos).

Algunos de los mecanismos de radioprotección de estas sustancias son el secuestro de radicales libres, la reducción en la generación de especies reactivas del oxígeno o nitrógeno (ROS/RNS), el incremento del nivel de glutatión, la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas, el aumento de la reparación del ADN, el incremento de la proliferación celular, la detención del ciclo celular, estabilización del potencial de membrana del citoplasma y mitocondria (Arora *et al.*, 2005).

2.8.2. Origen y Composición del propóleo.

El propóleo es el nombre genérico de una sustancia fuertemente adhesiva y resinosa que es recolectada y transformada por las abejas (Figura 2.13a). El propóleo se utiliza en la construcción, reparación y protección de la colmena (Guisalberti, 1979).

Las abejas (género *Apis*) (Figura 2.13b) recogen con sus mandíbulas la resina de las grietas de la corteza de los árboles y de los brotes y pecíolos de las hojas. La resina recogida es masticada, y tras la adición de enzimas salivares y la digestión parcial del material, se mezcla con la cera y es usada en la colmena (Marcucci *et al.*, 1995).



Figura 2.13: Propóleos y Abeja (del género *Apis*).

En la colmena, para evitar la extensión de infecciones y enfermedades, las abejas utilizan el propóleos para embalsamar a otros organismos vivos intrusos en la colmena. Así de esta manera, la presencia de propóleos puede contribuir a un ambiente nada propicio para el crecimiento de bacterias y otros microorganismos. Se sugiere que el propóleos es el responsable de la baja presencia de hongos y bacterias en la colmena (Guisalberti, 1979).

La composición precisa del propóleos salvaje muestra cierta variabilidad según su origen. En general, está compuesto de un 50% de resina y bálsamos vegetales, un 30% de cera, un 10% de aceites esenciales y aromáticos, un 5% de polen y un 5% de otras sustancias; incluyendo restos orgánicos. Además contienen pequeñas cantidades de terpenos, taninos, restos de la secreción de las glándulas salivares de las abejas y posibles contaminantes.

Gracias a su contenido en aceites esenciales, el propóleos suele ser aromático y en función de la época de recolección y su origen botánico difiere en color, sabor (amargo, ligeramente picante o insípido) y consistencia (Bracho *et al.*, 1996).

La manera usual de extraer la fracción soluble es con etil-alcohol (EEP, extracto etanólico de propóleos), llamado “bálsamo de propóleos”, eliminando la fracción insoluble en alcohol y la cera.

El primer paso es un lavado de agua fría que elimina la cera superficial y secado al aire. El segundo paso implica la disolución del propóleos en 95% de etil-alcohol, eliminando restos de residuos y finalmente se filtra.

Los primeros trabajos llevados a cabo para la estimación de la composición del propóleos fueron llevados a cabo por Kustenmacher (1911), donde identificaron el ácido cinámico y el alcohol cinámico como constituyentes del propóleos, y de Dieterich (1911) que detectó rastros de vanilina. Jaubert (1926) encontró que el color de la cera de las abejas se debía al pigmento flavonoide crisina, desde entonces se han descrito otros flavonoides que formaban parte de muestras de propóleos; Lavie *et al.* (1960) aislaron la galangina, la pinocembrina, crisina, tecnocrisina y isalpinina; Popravko *et al.* (1969) aplicando técnicas de separación aislaron seis pigmentos flavonoides más; Posteriormente, Guisalberti (1979) consiguió aislar el ácido cafeico y felúrico.

Los métodos de análisis de que se disponen en la actualidad permiten detectar un número cada vez mayor de compuestos en el propóleos (tabla 2.1) (Farré *et al.*, 2004).

COMPOSICIÓN	(%)	COMPUESTOS, CARACTERÍSTICAS Y OBSERVACIONES
Resinas	45-55	Flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres
Ceras	7.55 a 35	La mayoría cera de abeja, también de origen vegetal
Aceites esenciales	5-10	Volátiles
Ácidos grasos	5	La mayoría proceden de la cera y el resto dependen del origen botánico
Polen	5	Proteínas del polen y aminoácidos libres. Predominan arginina y prolina
Otros compuestos orgánicos y minerales	5	-14 oligoelementos Fe y Zn son los más abundantes, otros: Au, Ag, Cs, Hg, K, Sb. -Cetonas -Lactosas y otros azúcares -Quinonas -Esteroides -Ácido benzoico y ésteres -Vitaminas: B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₆ . Pequeñas cantidades procedentes principalmente del polen.

Tabla 2.1: Composición, características y observaciones del propóleo.

El propóleo es un producto de extraordinario interés para la medicina e industria farmacéutica, al que se le atribuyen efectos anti-inflamatorios, inmuno-estimulantes, hepato-protectores, antivirales, anti-fúngicos, anti-protozoarios, carcinostáticos, anti-microbianos, anestésicos y de regeneración tisular (Farré *et al.*, 2004).

2.8.3. Efecto radioprotector del propóleo.

El efecto radioprotector del propóleo puede explicarse gracias a diversos mecanismos como son: secuestrador de radicales libres,

incremento del nivel de glutatión, respuesta inflamatoria, incremento de la proliferación celular e inducción de la detención del ciclo celular.

Secuestrador de radicales libres.

La primera evaluación del extracto etanólico de propóleos (EEP) como agente radioprotector frente a la radiación ionizante fue llevada a cabo por Scheller *et al.* (1988). En este estudio se observó que tras inyectar EEP a ratones intraperitonealmente antes y después de ser expuestos a una dosis de 6 Gy de rayos γ , los ratones tratados con EEP sobrevivieron a la irradiación, mientras que los no tratados no sobrevivían a las 12 semanas. Posteriormente, Krol *et al.* (1990) estudiaron la oxidación de la molécula luminol utilizando H_2O_2 en estudios *in vitro*. La reacción de oxidación del luminol va acompañada de emisión de luz, medida mediante quimio-luminiscencia. Los autores observaron una inhibición de la quimio-luminiscencia con el incremento de la concentración de EEP, atribuyendo el efecto antioxidante al elevado contenido en flavonoides.

Se han realizado estudios donde se han evaluado el efecto de extractos de propóleos en diversas enzimas que catalizan reacciones de oxido-reducción. Se ha descrito una inhibición de la xantina oxidasa (Volpert *et al.*, 1993, Chen *et al.*, 2004, Watabe *et al.*, 2004). La estimulación de la superóxido dismutasa (El-Ghazaly *et al.*, 1995), la inhibición de la mieloperoxidasa y la NAP oxidasa (Volpert *et al.*, 1996) la modificación del estado redox también ha sido descrita por Chiao *et al.* (1995), Natarajan *et al.* (1996) y Volpert *et al.* (1996).

Incremento del nivel de glutathion.

El nivel de Glutathion reducido (GSH) mantiene a las células en un potencial redox óptimo, por lo que protege a las células. Es junto con la superóxido dismutasa y la catalasa, una barrera de defensa antioxidante. La GSH posee capacidad reductora al estar compuesta por 3 amino ácidos que poseen grupos sulfidrilo (SH), la cisteína, glicina y ácido glutámico. Chen *et al.* (2001), estudiando diversas líneas celulares derivadas de leucemias humanas, describió que la disminución del GSH provocada por el ácido cafeico (constituyente del propóleo) aumentaba la apoptosis.

Respuesta anti-inflamatoria, Peroxidación lipídica y oxidación de proteínas.

Como ya se ha descrito anteriormente, los radicales libres, provocados por las radiaciones ionizantes, provocan la peroxidación de los lípidos componentes de membrana. Esto puede provocar una respuesta inflamatoria como resultado de la muerte celular. Respuesta, que en el caso de la radiación, va asociada tanto al aumento de prostaglandinas como de leucotrienos. De una parte Kimoto *et al.* (2001a) estudiando los tumores inducidos en ratón mediante el carcinógeno Fe-NTA, describieron que el propóleo y concretamente el componente artepilina C era capaz de inhibir la peroxidación lipídica causada por el carcinógeno. El-Ghazaly *et al.* (1995) irradiando ratones con rayos gamma observaron una disminución de la peroxidación lipídica y de la respuesta inflamatoria en aquellos ratones a los que se les había administrado previamente un extracto acuoso de propóleo (APE). Por otra parte, existen diversos trabajos en donde el propóleo, extractos o

constituyentes aislados inhiben metabolitos de la ruta del ácido araquidónico como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, enzimas implicadas en el proceso inflamatorio (Krol *et al.*, 1990, Chintapally *et al.*, 1992, Volpert *et al.*, 1993, Chintapally *et al.*, 1993 y Natarajan *et al.*, 1996)

Inducción de la detención del ciclo celular. Efecto del propóleos en el ciclo de división celular.

El ciclo vital de una célula se puede dividir en dos fases, la interfase o intermitosis, y la mitosis o división celular. La interfase es la fase más larga del ciclo celular, y transcurre entre dos mitosis. En ella se produce una intensa actividad biosintética a todos los niveles lo que, junto al mantenimiento y crecimiento celular, prepara la fase de división. Durante esta fase la célula duplica sus componentes y especialmente su material genético, el ADN, lo cual ocurre en un periodo muy concreto de la interfase llamado fase S. Los periodos anterior y posterior a esta duplicación del ADN se denominan respectivamente fase G₁ y G₂.

Kimoto *et al.* (1998) en un trabajo llevado a cabo utilizando artepilina C (componente del propóleos) en varios cultivos de células tumorales apuntaron que los efectos observados en las células, mitosis abortivas, apoptosis y necrosis masiva, eran debidos a la inhibición de la síntesis del ADN en el ciclo celular entre las fases G₁/S o G₂/M.

Recientemente, Weng *et al.* (2005) sugieren que la crisina (constituyente del propóleos; en un 3,8%) muestra habilidad para bloquear a las células de glioma de rata en la fase G₁ del ciclo celular. El bloqueo se debía a la actuación de la crisina sobre p21

que inhibiría las quinasas, moléculas reguladoras del ciclo celular, concretamente CDK2 y CDK4. Además en el mismo estudio se ha observado un decrecimiento de los niveles de fosforilación de la proteína del Rb. La proteína Rb es una proteína reguladora del ciclo celular entre las fases G1 y S.

La inhibición del ciclo celular, además de llevarse a cabo por los puntos de control del ciclo celular, se puede producir por las proteínas MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógeno). La respuesta celular provocada por esta ruta de señalización incluye, un incremento en la transcripción de genes que a su vez regulan la expresión de genes cuyos productos inhiben el ciclo celular. En el mismo trabajo anteriormente citado, (Weng *et al.*, 2005) los resultados muestran que la crisina induce activación de la ruta de las proteínas MAPK (mediado por p38).

Acción citotóxica y antitumoral del propóleos

De todos los constituyentes del propóleos, uno de los compuestos responsables de las propiedades citostáticas es el CAPE (ácido cafeico). Se han realizado estudios utilizando diversas líneas celulares, y el CAPE ha mostrado efecto inhibitorio en la incorporación de timidina al ADN en células de carcinoma de mama (Grunberger *et al.*, 1988) y supresión del crecimiento de células humanas (Rao *et al.*, 1992).

La acción citostática del CAPE es preferencial y selectiva para células transformadas, no siendo citotóxico frente a células normales (Grunbergert *et al.*, 1988, Frenkel *et al.*, 1993, Su *et al.*, 1994 y Jin *et al.*, 2005). La actividad citostática del propóleos también la han

mostrado derivados naftalenos del propóleos, quercetín y fenil éster (Matsuno *et al.*, 1995).

Una de las características de las células cancerígenas es el crecimiento descontrolado. La expresión anormal de la actividad de enzimas como la tirosin quinasa (PTQ) y la ODC (ornitina descarboxilasa) pueden ser responsables de este descontrol. Heo *et al.* (2001) utilizando galangina (constituyente del propóleos) observaron que la actividad antiproliferativa se debía a la inhibición de la actividad PTQ, al inhibir la proliferación en células cancerígenas *in vitro* o inhibición de la enzima ODC (Zhen *et al.*, 1995).

Kimoto *et al.* (2001b), han estudiado líneas celulares de diferentes tipos de leucemia humana y el efecto del artepilina C (componente del propóleos). Los resultados mostraron un doble efecto, a bajas concentraciones de artepilina C poseía un efecto estimulador de la proliferación celular y a altas concentraciones un efecto inhibitor. Estos autores también describieron que el artepilina C tenía actividad citostática.

La modificación del ciclo celular en las células cancerígenas es uno de los mecanismos utilizados para detener o limitar el crecimiento tumoral.

Otra acción en la que el propóleos parece intervenir es en la apoptosis celular. Chen *et al.* (2001) observaron una disminución de la proteína Bid, que actúa desestabilizando la membrana mitocondrial y activando proteasas. Estudios posteriores han confirmado la activación de otras proteínas implicadas en la apoptosis (caspasas) (Woo *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 2004).

El propóleos también tiene influencia en los receptores de membrana implicados en los estadios iniciales de la apoptosis; como el receptor TNF (factor de necrosis tumores), bloqueando la activación del factor NF-kappaB (Natarajan *et al.*, 1996, Romashkova *et al.*, 1999, Na *et al.*, 2000, Watabe *et al.*, 2004 y Scifo *et al.*, 2004), el ligando Fas L, vía activación de la quinasa JNK, que activa un segundo grupo de genes supresores (p53) y la expresión de genes pro-apoptóticos (Bax) (Watabe *et al.*, 2004).

Por último, el propóleos es capaz de restaurar la deficiencia en uniones celulares (GAP) que poseen las células tumorales. La base molecular de esta restauración sería disminuyendo el nivel de p21 ras (Na *et al.*, 2000), y la inhibición de metaloproteinasas de matriz (MMPs) (Jin *et al.*, 2005). La restauración de GAP impide que las células tumorales adquieran capacidad para invadir otros tejidos.

Capítulo 3. Material y métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Elaboración de una curva de calibración dosis-respuesta.

Para evaluar citogenéticamente el efecto radioprotector del propóleo un primer objetivo fue elaborar previamente, como control, una curva de calibración dosis-efecto mediante el recuento de alteraciones cromosómicas. Las curvas de calibración dosis-efecto se utilizan para realizar estudios de dosimetría biológica, es decir, hacer una estimación de la dosis absorbida por una posible sobre-exposición a radiaciones ionizantes. Para poder realizar estos estudios un requisito indispensable es que cada laboratorio elabore sus propias curvas de calibración. Es por ello que la consecución de este estudio ha permitido al Servicio de Protección Radiológica del Hospital Universitario la Fe de Valencia contar desde el año 2000 con un Servicio de Dosimetría Biológica.

3.1.1 Obtención de la muestra.

Para la obtención de las curvas de calibración dosis-efecto, se han extraído muestras de sangre periférica de un individuo sano y sin historial de exposición a radiaciones ionizantes, ni mutágenos químicos. Las muestras se obtuvieron por venipunción anterocubital y se recogieron en tubos de 12.5 ml previamente heparinizados (heparina sódica al 1%).

Los tubos de plástico de 12.5 ml de punta redonda, se llenaron de sangre periférica evitando que quedasen burbujas de aire en su interior (figura 3.1).



Figura 3.1: Obtención de la muestra.

3.1.2 Consideraciones Físicas.

El equipo de irradiación.

Para las irradiaciones se utilizó el equipo THERATRON PHOENIX, ubicado en el Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital Universitario la Fe de Valencia. Durante las irradiaciones se siguieron las recomendaciones de la IAEA (1986) (figura 3.2).



Figura 3.2: Equipo de irradiación, THERATRON PHOENIX.

Las condiciones de irradiación de las muestras de sangre periférica.

- Para asegurar que la muestra esté incluida siempre dentro del haz, el campo de irradiación fue de 13 x 24 cm².
- Con el fin de emular las condiciones “in vivo”, durante la irradiación la muestra de sangre se conservó a 37°C.
- La irradiación se realizó en el seno de un maniquí de agua con la muestra colocada en su centro (figura 3.3, a) y asegurando un completo equilibrio electrónico.
- La dosis absorbida se evaluó según el protocolo de dosimetría utilizado en el Hospital Universitario la Fe (TRS-398 de la IAEA) teniendo en cuenta el *decay* de la fuente en los días correspondientes de las irradiaciones.

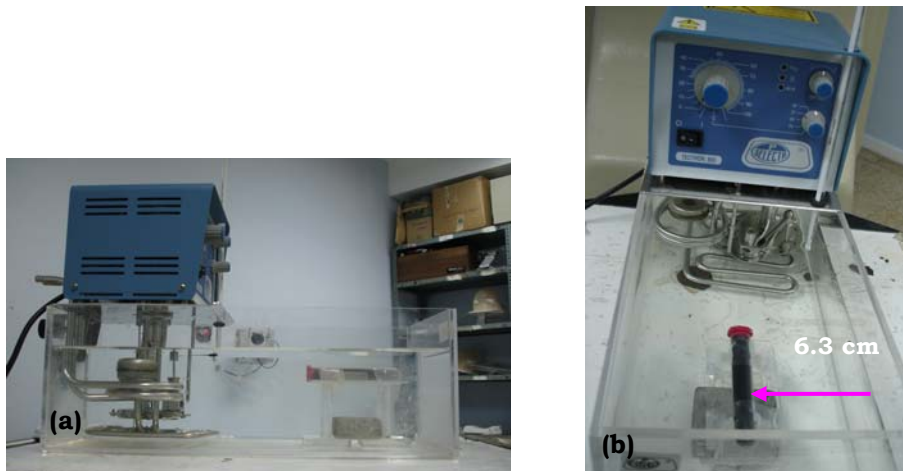


Figura 3.3: Cubeta de irradiación.

- Para conseguir una irradiación homogénea de dosis en todo el material, se utilizó dos campos opuestos de 90/270 grados del brazo de la unidad. Para ello la muestra se colocó a una profundidad en los campos laterales de 6.3 cm (figura 3.3).

Posteriormente se dejan las muestras durante una hora a 37°C antes de proceder al cultivo. La calibración de la unidad así como la determinación de la dosis, la realizó la Sección de Radiofísica y Protección Radiológica del Hospital Universitario la Fe.

Durante la irradiación la tasa de dosis que se utilizó en la muestra fue en las primeras cuatro dosis (de 0.1-0.75 Gy) de 30.73 cGy. min⁻¹ y en las restantes dosis (de 1-5 Gy) se utilizó una tasa de dosis de 30.65 cGy. min⁻¹, esta diferencia se debe al *decay* de la fuente, ya que la irradiación se realizó en dos días distintos.

Las dosis absorbidas suministradas se muestran en la tabla 3.1.

Dosis (cGy)	Tiempo (min)	Tiempo por cada haz (90°/270°)	Dosis real (cGy)
10	0.32	0.16/0.16	9.83
25	0.81	0.40/0.41	24.89
50	1.63	0.81/0.82	50.09
75	2.44	1.22/1.22	74.99
100	3.26	1.63/1.63	99.93
150	4.89	2.44/2.45	149.90
200	6.52	3.26/3.26	199.87
300	9.78	4.89/4.89	299.80
400	13.05	6.52/6.53	400.05
500	16.31	8.15/8.16	499.98

Tabla 3.1: Dosis absorbidas suministradas, tiempos de exposición por cada haz.

3.1.3. Condiciones de Cultivo.

Preparación del medio de cultivo, cultivo de la muestra y extracción del cultivo.

El medio de cultivo se prepara en condiciones de esterilidad, añadiendo a los 100 ml del medio base RPMI 1640, 4 ml de antibióticos, 20 ml de suero bovino fetal y 5 ml de fitohemaglutinina. El medio de cultivo completo se alicuota en tubos de cultivo estériles, en volúmenes de 5 ml que se conservan a -20°C .

A los 5 ml del medio de cultivo se le añaden 0.8 ml de sangre. Con el fin de analizar exclusivamente metafases que se encuentren en primera división mitótica, desde el inicio del cultivo se añade 5´bromo 2´deoxiuridina (BrdU) a una concentración final de $12\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Debido a que la BrdU es fotosensible, los tubos se envuelven en papel de aluminio.

Posteriormente se incuban los tubos de cultivo durante 48 horas a 37°C en un incubador de CO_2 .

Extracción del cultivo

Transcurridas 46 horas desde el inicio del cultivo se añaden 0.15 ml del antimitótico colcemid® a cada tubo de 5 ml de medio ($10\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Se continúa la incubación durante 2 horas más y posteriormente se centrifugan los tubos a 1200 r.p.m. durante 10 *min*.

Una vez centrifugado (figura 3.4, a), se elimina el sobrenadante (figura 3.4, b). El botón celular se resuspende en una solución hipotónica (figura 3.4, c) (0,075 M de KCl) precalentada a 37°C , y se incuba durante 30 minutos. Acabado este proceso, los tubos se dejan en el baño y se centrifuga 10 *min* a 1200 r.p.m. Posteriormente se elimina el sobrenadante con una pipeta Pasteur.

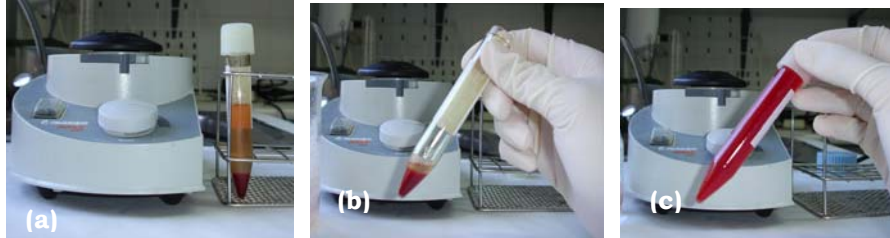


Figura 3.4: Extracción del cultivo; Choque hipotónico.

El botón celular se resuspende en fijador Carnoy (metanol: ácido acético, 3: 1), hasta enrasar el tubo (figura 3.5, a). Es importante que se añadan los primeros 1.5 ml gota a gota de manera constante por las paredes del tubo y se agite con el vórtex, ya que durante la fijación se produce la hemólisis de los eritrocitos y si ésta se produce de manera brusca se puede aglutinar la suspensión. Finalmente se vuelve a centrifugar durante 10 minutos a 1200 r.p.m. Para eliminar los restos citoplasmáticos, se realizan 2 lavados más con Carnoy. Se decanta el sobrenadante (figura 3.5, b), se resuspende el botón celular (figura 3.5, c; flecha negra) con Carnoy, y se centrifuga a 1200 r.p.m. durante 10 minutos.

Finalizado el último lavado, se decanta el sobrenadante y se resuspende el botón con 10-15 gotas de Carnoy, se hace una extensión y se observa en el microscopio de contraste de fases si la preparación está suficientemente limpia, si no es así se realizan más lavados.

Una vez realizadas las extensiones cromosómicas se dejan envejecer 2 días a 37° C. Los tubos con el fijador se pueden guardar en nevera.

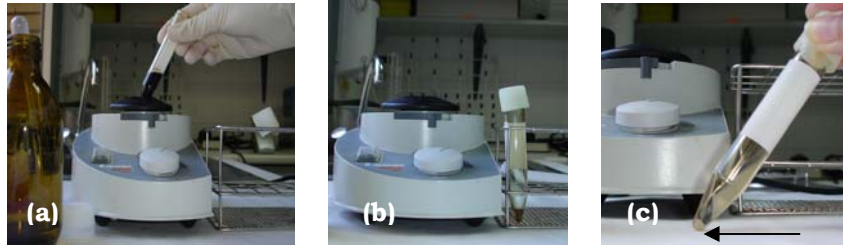


Figura 3.5: Extracción del cultivo; Lavados con Carnoy, la flecha negra indica el celular.

Tinción de la preparación.

Los portaobjetos se sumergen durante 20 minutos en una solución del colorante bisbenzimidá (Hoechst 33258), a la concentración de 150 mg.ml^{-1} , durante 20 minutos. Posteriormente, se limpian con agua destilada, y se dejan secar durante 30 minutos. Una vez secos se cubren con 2xSSC (figura 3.6, a) y se coloca el cubreobjetos. Los portaobjetos son expuestos a una luz de 300W durante 2-3 minutos (figura 3.6, b), se lavan con agua destilada. Se dejan secar y se tiñen con el colorante Leishman (figura 3.6, c) (Buffer de Leishman: colorante de Leishman, 4:1) durante 5 minutos.

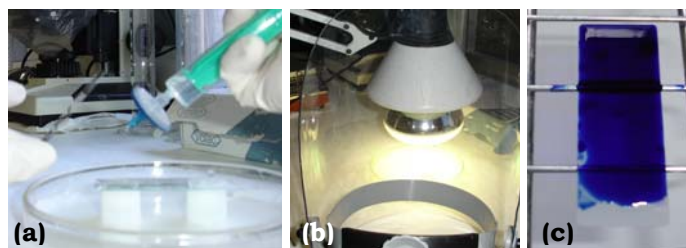


Figura 3.6: Secuencia de pasos de la técnica de tinción *Fluorescente Plus*.

3.1.4 Análisis Citogenético

Las anomalías cromosómicas consideradas en la presente tesis fueron: cromosomas dicéntricos y cromosomas en anillo, que sólo se consideraron cuando estaba presente un mínimo de un fragmento acéntrico. Los fragmentos acéntricos, no asociados a cromosomas dicéntricos o anillos y roturas cromosómicas, se contabilizaron conjuntamente como fragmentos acéntricos extra. Otros tipos de anomalías tipo cromosoma como inversiones y translocaciones sólo se contabilizaron cuando la morfología del cromosoma derivado era claramente indicativa de este tipo de reordenamiento. Las anomalías como roturas de cromátidas y “gaps” de cromosomas y cromátidas se contabilizaron por separado.

3.1.5 Análisis estadístico

Cálculo del índice de dispersión y la unidad normalizada del índice de dispersión

Tras irradiaciones homogéneas de baja LET, como la utilizada en el presente estudio, la distribución de dicéntricos y dicéntricos más anillos por célula sigue una distribución de *Poisson*, mientras que los fragmentos acéntricos extra tienden a estar sobredispersos (Edwards, 1979).

Para las distintas irradiaciones la primera comprobación que se realizó fue evaluar si la distribución por célula de las distintas anomalías sigue una distribución de *Poisson*. Para ello se utilizó el índice de dispersión (1) y la unidad normalizada de este índice (2) (Papworth, 1975).

$$ID = \sigma^2/y \quad (1)$$

donde el índice de dispersión (ID) es igual al cociente entre la varianza σ^2 y la frecuencia por célula de dicéntricos (y).

La Unidad normalizada del índice de dispersión se calcula:

$$U = ID - (N - 1)/(\text{VAR D})^{1/2} \quad (2)$$

N es el número de células analizadas y VAR D es la varianza del índice de dispersión (3).

$$\text{VAR D} = 2 \cdot (N-1) \cdot [1 - (1/N \cdot Y)] \quad (3)$$

donde N es el número de células analizadas y Y es el número total de anomalías.

Valores de U comprendidos en el intervalo ± 1.96 indican que la distribución de anomalías sigue una distribución de *Poisson*.

Obtención de los coeficientes de las curvas de calibración dosis - efecto

Para obtener los coeficientes de la curva dosis-efecto, se escogió el método de la ponderación iterativa de mínimos cuadrados, ajustando los valores observados a una función lineal-cuadrática ($y = C + \alpha D + \beta D^2$). La ponderación iterativa de mínimos cuadrados se realizó ponderando por el inverso del número de células analizadas. Esta ponderación asume que en cada punto de la curva la distribución de anomalías sigue una distribución de *Poisson*. La iteración consiste en repetir el proceso de mínimos cuadrados utilizando en cada caso el número de anomalías esperadas en la ponderación anterior.

Este proceso se repite hasta que los coeficientes obtenidos en una iteración no varíen respecto a los obtenidos en la iteración anterior.

Este método consiste en la obtención inicial de unos coeficientes C , α y β a partir de la minimización de la ecuación 1.

$$\Sigma w_j (y_j - \bar{y}_j)^2 \quad (1)$$

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2 \quad (2)$$

donde y_j es la frecuencia observada de la alteración cromosómica considerada en cada dosis, \bar{y}_j es la frecuencia esperada a partir de la función teórica (2), w_j es el factor de ponderación.

En la primera obtención de los coeficientes C , α y β de la función teórica 2, el factor de ponderación viene dado por $w_j = 1/(y_j/N_j)$, donde N_j es el número de células analizadas a cada dosis. Esta ponderación satisface el criterio de maximizar las frecuencias observadas a partir de un número elevado de células.

Una vez encontradas las constantes C , α y β correspondientes al primer ajuste, así como las frecuencias esperadas \bar{y}_j para cada dosis, se procede a una segunda iteración mediante el cálculo de nuevos valores C' , α' y β' , esta vez utilizando como factor de ponderación $w_j = 1/(\bar{y}_j/N_j)$, es decir utilizando la y esperada a partir de la primera ponderación \bar{y}_j . Esta iteración se repite hasta que los valores C^i , α^i y β^i no varíen respecto a los valores C^{i-1} , α^{i-1} y β^{i-1} . Para valorar la fiabilidad de la curva, se han calculado los porcentajes de error relativos de los tres coeficientes.

3.2. Extracto etanólico de propóleos (EEP). Extracción, evaluación de los extractos.

Para el siguiente estudio se han utilizado diversos productos de la empresa Dietéticos Intersa S.A. (Torreserona, Lérida):

- Propóleos al 70% de etanol
- Propóleos al 20% de etanol
- Cápsulas de 250 mg de propóleos al 100% puro.
- Propóleos masticable 100 % puro, bañado en extracto de propóleos al 20%.

En el presente estudio para realizar la evaluación del efecto protector del propóleos se partió de propóleos en polvo presente en cápsulas, debido a que se puede controlar más fácilmente las concentraciones finales que se utilizan.

A partir del propóleos en cápsulas, se evaluaron distintos solventes:

- Agua, son varios autores que en sus publicaciones extraen el propóleos con agua (Song *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2002). En nuestro caso no se obtuvo una mezcla homogénea del propóleos.
- Metanol, según Hladón *et al.* (1980) y Ban *et al.* (1983), de varios solventes utilizados fue el metanol el que daba mejores resultados. En nuestro caso, si bien en este caso el propóleos se mezcló homogéneamente con el metanol, los cultivos preliminares de sangre sin irradiar no crecían.

En la tabla 3.2 se muestran las distintas soluciones realizadas con el metanol y agua, como solventes.

Tubo	Preparado
1	0.5 g de propóleos + 10 ml de metanol
2	0.5 g de propóleos + 8 ml de metanol + 2 ml de H ₂ O
3	0.5 g de propóleos + 7.5 ml de metanol + 2.5 ml de H ₂ O
4	0.5 g de propóleos + 5 ml de metanol + 5 ml de H ₂ O
5	0.5 g de propóleos + 10 ml de H ₂ O

Tabla 3.2: Preparados de propóleos partiendo de las cápsulas de extracto puro en polvo utilizando como solvente el metanol y el agua.

- Etanol, de acuerdo con Marcucci *et al.* (1995); y Burdock *et al.* (1998), se utilizó como solvente el etanol. El propóleos puro en cápsulas se disolvió a distintas concentraciones (tabla 3.3).

Preparado	Concentración final
500 mg + 5 ml etanol 95%	100 mg.ml ⁻¹
500 mg + 10 ml etanol 95%	50 mg.ml ⁻¹
250 mg + 10 ml etanol 95%	25 mg.ml ⁻¹

Tabla 3.3: Preparados de propóleos partiendo de las cápsulas de extracto puro en polvo utilizando como solvente el etanol al 95%.

La mezcla se agitó vigorosamente en el vortex y se introdujo durante 7-8 días en nevera. Posteriormente se agitan vigorosamente con el vortex y se centrifugan durante 10 minutos a 1200 r.p.m. Una vez se centrifuga se obtiene un precipitado blanco que corresponde a la cera. El sobrenadante se extrae y se filtra con un filtro millipore® de 0.22 µm para eliminar posibles impurezas.

Los cultivos preliminares tuvieron un buen crecimiento para las tres concentraciones, siempre y cuando el volumen de extracto añadido al cultivo no superase 250 µl.

Obtención de la fracción protegida máxima.

Para evaluar si la frecuencia de dicéntricos se modifica al cambiar las concentraciones de propóleos, los valores obtenidos de las distintas concentraciones se ajustaron a una función exponencial negativa (Roots y Okada, 1975). Cuando incrementamos la concentración de propóleos la frecuencia de dicéntricos disminuye hasta alcanzar el límite más bajo (Fnp) que representa la porción no protegible de las alteraciones cromosómicas. El componente protegido (Fp) decrece exponencialmente con el incremento de la concentración de propóleos. La dependencia de la frecuencia Y con la concentración de propóleos [C] se describe como:

$$Y (C) = Y (0) [Fnp + (1-Fnp) \exp (-\gamma C)]$$

donde, Fnp: fracción no protegible del daño cromosómico, (1-Fnp) = Fp: fracción protegible del daño cromosómico, Y(C): frecuencia de dicéntricos a la concentración de propóleos C, Y(0): frecuencia de dicéntricos sin propóleos y γ : parámetro exponencial. Los valores Fnp y γ son los obtenidos tras el ajuste.

Para llevar a cabo este cálculo utilizamos el ajuste por mínimos cuadrados.

3.3 Determinación del índice mitótico e índice de proliferación celular

Para el análisis del IM (índice mitótico) y el IP (índice de proliferación) se analizaron preparaciones de cultivos de 72 horas.

Para el cálculo del IM se analizó un mínimo de 500 células, y para el cálculo del IP 100 células.

El índice mitótico se determinó analizando el número de metafases en un total de 8360 células. El índice mitótico relativo (IMR) se evaluó como $IMR = [IM \text{ células tratadas} / IM \text{ células control}] \times 100$ (Rojas *et al.*, 1993).

A continuación se muestra una figura donde se distingue una metafase, de un total de 4 células.

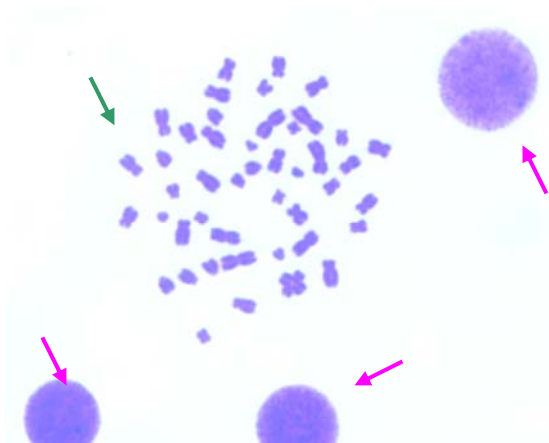


Figura 3.7: Fotografía que muestra tres núcleos (flecha rosa) y una metafase (flecha verde) en un total de cuatro células.

Para el cálculo del índice de proliferación o IP, se analizaron 100 células por concentración, para determinar la M1 (metafase en primera división con cromátidas oscuras, figura 3.8, a), M2 (metafase en segunda división con mitad de cromátidas oscuras y mitad claras (arlequín), figura 3.8, b) y M3 (metafase en tercera división, con parte de las cromátidas oscuras y parte claras, figura 3.8, c). El IP (índice de proliferación) fue calculado por la fórmula $IP = M1 + 2M2 + 3M3/100$ (Lamberti *et al.*, 1983). El índice de proliferación relativo (IPR) se evaluó como $IPR = [IP \text{ células tratadas} / IP \text{ células control}] \times 100$ (Rojas *et al.*, 1993).

En la figura 3.8 se muestran tres imágenes para distinguir las metafases en primera, segunda y tercera división mitótica para calcular el índice de proliferación celular (IP).

Cálculo del porcentaje de reducción y los errores, del índice de proliferación e índice mitótico.

- Índice de proliferación (IP)

El porcentaje de reducción se calcula como sigue:

$$100 - ((IP_x \cdot 100) / IP_0)$$

donde IP_x equivale al índice de proliferación de la concentración a evaluar y IP_0 equivale al índice de proliferación sin propóleos.

El error del porcentaje se calcula:

$$((M1 (1 - IP_x)^2 + M2 (2 - IP_x)^2 + M3 (3 - IP_x)^2) / ((N_x - 1) / N_x))^{1/2}$$

donde, M1, M2 y M3 corresponde, respectivamente, a las metafases analizadas en primera, segunda y tercera división celular).

donde, N_x equivale son el número de células analizadas a la concentración que evaluamos.

- Índice mitótico (IM)

El porcentaje de reducción se calcula:

$$100 - ((IM_x \cdot 100)/IM_0)$$

donde, IM_x equivale al índice mitótico de la concentración a evaluar y IM_0 equivale al índice mitótico sin propóleos.

El error se calcula:

$$(IM_x \cdot (1 - IM_x)/N_x)^{1/2}$$

donde N_x equivale son el número de células analizadas a la concentración que evaluamos.

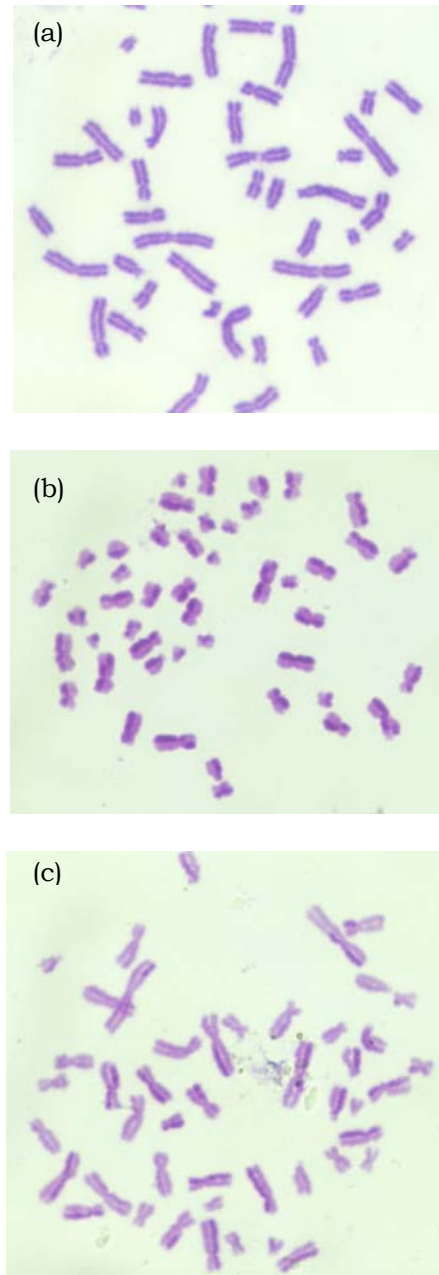


Figura 3.8: Metafasas en primera (a), segunda (b) y tercera (c) división.

3.4 Estudio citogenético del efecto radioprotector del extracto etanólico de propóleos.

3.4.1 Evaluación inicial del efecto radioprotector.

Si bien existen diversos trabajos en los que se ha evaluado el efecto radioprotector del propóleos o de alguno de sus componentes, no existe ningún estudio en el que este efecto se evalúe citogenéticamente. Por esta razón, y teniendo en cuenta que sólo el extracto etanólico de propóleos (EEP) permitió el crecimiento y obtención de metafases a partir de linfocitos de sangre periférica, se realizaron estudios preliminares. Estos primeros estudios permitieron evaluar si el EEP, disminuía el daño genético inducido por las radiaciones ionizantes, al reducir el número de alteraciones cromosómicas.

El tratamiento con propóleos consistió en añadirlo 1 hora antes o inmediatamente después de irradiar. Las dosis de irradiación fueron 2 y 5 Gy (tabla 3.4).

Modalidad	Concentración propóleos [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]			Etanol 95%	
	1 hora antes de irradiar			1 hora después de irradiar	
2 Gy	0	1000	2000	1000	0
5 Gy	0	1000	2000	-	-

Tabla 3.4: Irradiaciones preliminares a 2 y 5 Gy y distintas concentraciones de propóleos y etanol al 95%.

3.4.2 Influencia de la concentración del EEP.

Los tubos de sangre periférica se irradiaron a la dosis de 2 Gy y a concentraciones de propóleos de 20, 40, 120, 250, 500, 750, 1000 y 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. En todas los casos el volumen de etanol al 95% que se añadió a la sangre fue de 250 μl .

La extracción se llevó a cabo con etanol, el efecto aditivo radioprotector del etanol se evaluó irradiando un tubo a 2 Gy y con 250 μl de etanol sin propóleos.

3.4.3 Influencia de la dosis en el EEP.

Irradiación de las muestras a distintas dosis de radiación gamma con muestras de sangre periférica en presencia y ausencia de propóleos. Las dosis de irradiación escogidas dentro de del rango de dosis entre 0 y 5 Gy fueron 0.25, 0.5, 1, 2 y 5 Gy.

A la vista de los resultados obtenidos en el epígrafe anterior la concentración del extracto etanólico escogida fue 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Las condiciones de cultivo, análisis citogenético y estadístico son las mismas que las utilizadas en el apartado 3.1 de la presente Tesis.

Para comprobar que el extracto de propóleos no tenía efecto citostático en los cultivos de sangre se analizó un tubo a la concentración de estudio sin irradiar.

Capítulo 4. Resultados y discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Elaboración de una curva de calibración dosis – respuesta.

Se han analizado un total de 11229 metafases correspondientes a las muestras irradiadas a 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4 y 5 Gy. La tabla 4.1 muestra el número y tipo de alteraciones cromosómicas observadas.

Dosis (Gy)	N	Dic	Ani	Ace	Otros	Ctb	Gaps	NA
0	2030	2	-	7	-	1	6	16
0.1	2131	10	-	43	1	1	17	72
0.25	1502	14	1	37	4	-	4	60
0.5	1501	49	5	58	6	4	7	129
0.75	1559	78	7	100	11	6	8	210
1	962	101	6	101	12	6	18	244
1.5	562	102	12	86	11	6	8	225
2	440	127	15	103	4	6	6	261
3	287	143	10	111	10	5	8	287
4	136	102	7	76	8	3	3	199
5	119	159	14	124	22	2	2	323

Tabla 4.1: Resultados citogenéticos obtenidos tras irradiación a diferentes dosis de rayos γ (N: número de células; Dic, dicéntricos; Ani, anillos; Ace, acéntricos; Otros, incluye translocaciones, inversiones etc; Ctb, rotura de cromátidas, incluyendo radiales; Gaps de cromosoma y cromátida; NA: número total de alteraciones)

Ejemplos de estas alteraciones cromosómicas son presentados en las figuras 4.1 y 4.2.

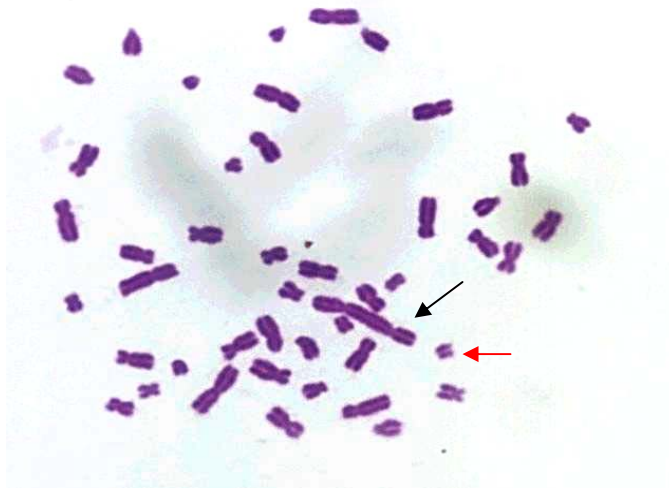


Figura 4.1: Metafase en primera división mitótica con un cromosoma dicéntrico y su correspondiente **acéntrico**.

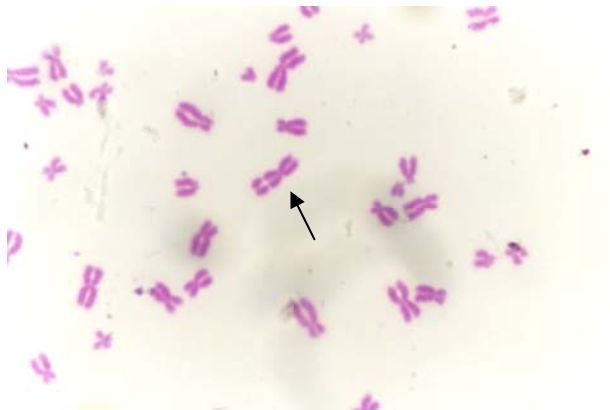


Figura 4.2: Metafase en primera división mitótica con un “gap” de cromosoma.

La tabla 4.2 muestra para las distintas dosis de irradiación las frecuencias por célula y su correspondiente error de dicéntricos, dicéntricos más anillos, acéntricos y número de alteraciones totales. Tanto las frecuencias de las distintas alteraciones como la frecuencia del total de alteraciones cromosómicas se incrementan a medida que la dosis de irradiación aumenta.

En las tablas 4.3, 4.4 y 4.5 se muestra la distribución de dicéntricos, dicéntricos más anillos y acéntricos por célula, respectivamente y el valor del índice de dispersión y la unidad normalizada de este índice.

Los valores de las unidades normalizadas U de las tablas 4.3, 4.4 y 4.5, comprendidas en el intervalo ± 1.96 indican que no se puede rechazar la hipótesis de que la distribución siga una *Poisson*. En el caso de la distribución de dicéntricos por célula todos los valores son acordes con una distribución de *Poisson*. Estos resultados confirman que tras irradiaciones homogéneas con radiaciones de baja LET la distribución de dicéntricos por célula sigue una *Poisson* (Edwards *et al.* 1979). Cuando estudiamos la distribución de dicéntricos más anillos por célula, solo a la dosis de 5 Gy el valor de U es inferior a -1.96 . Debido a que en la mayoría de las dosis se sigue una distribución de *Poisson*, no hay razón para rechazar que también la distribución de dicéntricos más anillos por célula sigue una *Poisson*. Por último, para acéntricos en cinco de las dosis los valores de U son mayores a $+1.96$, indicando que existe sobredispersión. Los resultados confirman que los acéntricos extra tienden a mostrar sobredispersión (Edwards *et al.*, 1979).

Dosis (Gy)	N	Dic	Y ± SE	Dic + Ani	Y ± SE	Ace	Y ± SE	NA	Y ± SE
0	2030	2	0.001±0.001	2	0.001±0.001	7	0.003±0.001	16	0.01±0.002
0.1	2131	10	0.005±0.001	10	0.005±0.001	43	0.020±0.003	72	0.03±0.004
0.25	1502	14	0.01±0.002	15	0.01±0.003	37	0.025±0.004	59	0.04±0.005
0.5	1501	49	0.03±0.005	54	0.04±0.005	58	0.04±0.005	129	0.09±0.008
0.75	1559	78	0.05±0.006	85	0.05±0.006	100	0.06±0.006	210	0.13±0.009
1	962	101	0.10±0.010	107	0.11±0.011	101	0.10±0.012	244	0.25±0.016
1.5	562	102	0.18±0.017	114	0.20±0.018	86	0.15±0.018	225	0.35±0.023
2	440	127	0.29±0.027	142	0.32±0.027	103	0.23±0.024	261	0.59±0.037
3	287	143	0.50±0.044	153	0.53±0.044	111	0.39±0.041	287	1.00±0.059
4	136	102	0.75±0.077	109	0.80±0.076	76	0.56±0.075	199	1.46±0.104
5	119	159	1.34±0.100	173	1.45±0.091	124	1.04±0.098	323	2.71±0.151

Tabla 4.2: Para cada dosis (Gy), número de células analizadas (N), frecuencia por célula de dicéntricos (Dic), frecuencia por célula de dicéntricos más anillos (Dic + Ani), frecuencia por célula de acéntricos (Ace), número de alteraciones totales (NA) y su correspondiente error (SE).

Dosis (Gy)	Dic	Cél. con 0 Dic	Cél. con 1 Dic	Cél. con 2 Dic	Cél. con 3 Dic	Cél. con 4 Dic	ID	<i>U</i>
0	2	2028	2	-	-	-	1.00	- 0.02
0.1	10	2121	10	-	-	-	1.00	- 0.15
0.25	14	1488	14	-	-	-	0.99	- 0.25
0.5	49	1452	49	-	-	-	0.97	- 0.89
0.75	78	1483	74	2	-	-	1.00	0.05
1	101	865	93	4	-	-	0.98	- 0.55
1.5	102	465	92	5	-	-	0.92	- 1.38
2	127	332	93	11	4	-	1.08	1.13
3	143	178	83	18	8	-	1.09	1.12
4	102	63	54	11	6	2	1.06	0.51
5	159	33	35	31	18	2	0.89	- 0.84

Tabla 4.3: Para cada dosis (Gy), distribución de dicéntricos (Dic) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (*U*).

Dosis (Gy)	Dic + Ani	Cél. Con 0 (Dic + Ani)	Cél. Con 1 (Dic + Ani)	Cél. Con 2 (Dic + Ani)	Cél. Con 3 (Dic+Ani)	Cél. Con 4 (Dic+Ani)	ID	<i>U</i>
0	2	2028	2				1.00	-0.02
0.1	10	2121	10				1.00	-0.15
0.25	15	1487	15				0.99	-0.26
0.5	54	1447	54				0.96	-0.98
0.75	85	1476	81	2			0.99	-0.19
1	107	859	99	4			0.96	-0.78
1.5	114	453	104	5			0.89	-1.91
2	142	317	108	11	4		1.00	0.05
3	153	168	93	18	8		1.02	0.23
4	109	57	59	12	6	2	0.98	-0.20
5	173	19	49	31	18	2	0.67	-2.52

Tabla 4.4: Para cada dosis (Gy), distribución de dicéntricos más anillos (Dic + Ani) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (*U*). En negrita valor de *U* menor a 1.96.

Dosis (Gy)	Ace	Cél. con 0 ace	Cél. con 1 ace	Cél. con 2 ace	Cél. con 3 ace	Cél. con 4 ace	Cél. con 5 ace	ID	<i>U</i>
0	7	2023	7					1.00	-0.10
0.1	43	2093	34	3	1			1.26	8.57
0.25	37	1465	37					0.98	-0.67
0.5	58	1445	54	2				1.03	0.86
0.75	100	1461	96	2				0.98	-0.66
1	101	877	69	16				1.21	4.69
1.5	86	489	61	11	1			1.17	2.94
2	103	351	75	14				1.04	0.60
3	111	203	64	15	3	2		1.27	3.20
4	76	85	34	11	4	2		1.37	3.08
5	124	45	39	24	8	2	1	1.10	0.74

Tabla 4.5: Para cada dosis (Gy), distribución de acéntricos (Ace) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (*U*). En negrita valores de *U* mayores a 1.96.

Cabe señalar que valores sobredispersados aumentan la incertidumbre de la medida, por lo que dificulta su utilización para estudios de dosimetría biológica (Lloyd y Edwards, 1984).

La exposición de linfocitos a radiación ionizante produce alteraciones cromosómicas. De estas alteraciones, los cromosomas dicéntricos son un buen indicador de la dosis ya que son de fácil identificación y por su baja frecuencia basal. Los cromosomas en anillo, si bien también son de fácil identificación y su frecuencia basal es muy baja, se inducen a una frecuencia inferior a la de los cromosomas dicéntricos. Es por esta baja inducción que los cromosomas en anillo, o bien no se utilizan en los estudios de dosimetría biológica, o si se utilizan se consideran conjuntamente con los cromosomas dicéntricos. Por otro lado, los acéntricos son un indicador de dosis más incierto. Los acéntricos tienen una mayor frecuencia basal en la población debido a efectos confusos de otros mutágenos no-radiológicos (Lloyd y Edwards, 1983). Por estas razones en el presente estudio se han escogido los dicéntricos para elaborar la curva y sus coeficientes.

La tabla 4.6 muestra los valores de C , α y β de la función lineal cuadrática obtenidos tras la ponderación iterativa de mínimos cuadrados. La tabla 4.6 también muestra la significación que cada coeficiente tiene dentro de la curva.

Coefficientes	Valores	t-student	p
<i>C</i>	$(0.07 \pm 0.06) 10^{-2}$	1.16	-
<i>α</i>	$(4.13 \pm 0.58) 10^{-2}$	7.10	< 0.01
<i>β</i>	$(4.44 \pm 0.33) 10^{-2}$	13.34	< 0.01

Tabla 4.6: Valores de los coeficientes C , α y β de la función $Y = C + \alpha D + \beta D^2$, y su error estándar de la curva dosis-efecto para dicéntricos.

Para valorar si existe un buen ajuste entre los valores observados y la curva se utilizó el estadístico χ^2 . En nuestro caso el valor de la χ^2 obtenido 12.98 se contrastó con el valor de χ^2 con una probabilidad de 95% y 8 grados de libertad, que se obtiene restando del número de dosis utilizadas para la elaboración de la curva dosis efecto (11), el número de parámetros estimados (3). El valor percentil 95 de la χ^2 es de 15.5 superior al obtenido en nuestro ajuste, por lo tanto los resultados indican un buen ajuste entre los valores observados y los obtenidos tras el ajuste.

El coeficiente C con un valor de 1.16 menor que 2.31 para una *t-student* con 8 grados de libertad, no explica la curva, esto puede deberse al bajo número de células analizadas. Por el contrario los valores de la *t-student* para los coeficientes α y β son mayores a 2.31 y por tanto explican la curva. Esto indica que tanto el número de dosis utilizadas para la elaboración de la curva, como el número de células analizadas en cada dosis, han sido correctos.

Existen una gran cantidad de trabajos publicados en relación a la frecuencia de dicéntricos en linfocitos humanos. Los datos sobre

rayos X y gamma son muy abundantes pero muestran considerables variaciones interlaboratorios. Las variaciones son importantes tanto para el coeficiente α como el β . Probablemente, hay varias causas para estas diferencias como el diseño del experimento, método de cultivo celular, experiencia en el análisis y en los métodos de obtención de los coeficientes de la curva.

Cuando comparamos nuestra curva dosis-efecto con otras publicadas (tabla 4.7) (Lloyd y Edwards, 1983), se puede observar una similitud en los coeficientes obtenidos. Las pequeñas diferencias en la frecuencias de dicéntricos por célula podrían deberse al número de células analizadas, y la calidad de radiación utilizada.

Calidad de radiación	$\alpha \pm se$	$\beta \pm se$	α/β	Referencia
^{137}Cs	4.3 \pm 1.50	4.31 \pm 0.42	1.0	Takahashi <i>et al.</i> , 1982
^{60}Co	4.53 \pm 0.99	4.45 \pm 1	1.0	Stenstrand <i>et al.</i> , 1979
^{60}Co	4.9 \pm 1.39	5.31 \pm 0.64	0.9	Luchnik, 1975

Tabla 4.7: Calidad de radiación, coeficientes y valor de α/β para distintas curvas de calibración en la bibliografía.

El componente lineal, αD , es interpretado a menudo como el número de alteraciones causadas por el efecto de una única trayectoria de partícula, se espera que sea independiente de la tasa de dosis, además, al bajar la dosis este término lineal predomina. El término cuadrático, βD^2 , es interpretado como la interacción de 2 trayectorias de partículas independientes, y por lo tanto esta magnitud es importante para altas dosis y altas tasas de dosis.

Una de las propiedades de la función lineal-cuadrática es que el valor de α/β es la dosis a la cual la contribución en la formación de

dicéntricos por una única trayectoria es igual a la contribución producida por dos trayectorias. A dosis por debajo de ese valor, la mayoría de las aberraciones se producirán por una única trayectoria. El coeficiente α/β decrece a medida que las dosis se hacen, más significativas (Lloyd, 1975).

En la figura 4.3 se representan las frecuencias observadas de dicéntricos (\pm SE), así como la curva obtenida y el intervalo de confianza del 95% de esta curva.

Esta curva dosis-respuesta para rayos gamma se utiliza en estudios de dosimetría biológica cuando se sospecha de sobreexposiciones accidentales, tanto para miembros del público como trabajadores expuestos.

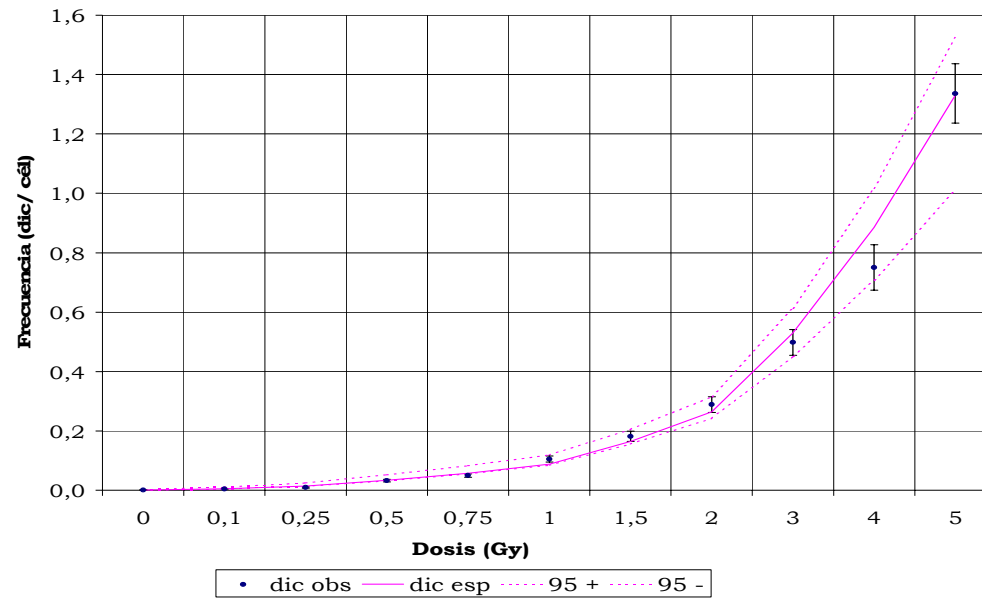


Figura 4.3: Curva de Calibración dosis –efecto para rayos γ (dic: dicéntricos, cel: célula, obs: observado, esp: esperado y SE: error estándar).

4.2 Influencia de la variación de la concentración del EEP a una misma dosis y cálculo de la fracción protegida máxima.

4.2.1 Evaluación inicial del efecto radioprotector del EEP.

Antes de iniciar el estudio sobre la influencia de la concentración de EEP en la disminución de alteraciones cromosómicas, se realizaron unos estudios preliminares para verificar la existencia de un efecto radioprotector que se pudiera observar como una disminución en la frecuencia de las alteraciones cromosómicas. Para ello se irradiaron muestras a 2 y 5 Gy en presencia o ausencia de EEP (extracto etanólico de propóleos, etanol 95%) y una evaluación para determinar si el efecto radioprotector del EEP se debía a su efecto durante la exposición a radiaciones ionizantes o bien a un efecto posterior a la exposición a las radiaciones ionizantes.

Antes de comenzar las irradiaciones y para estudiar si el EEP tiene efecto citotóxico en las células, se compararon las frecuencias de dicéntricos, dicéntricos más anillos y acéntricos por célula de tubos de sangre no irradiados y tratados en ausencia y presencia de EEP ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (tabla 4.8).

Al comparar las frecuencia de dicéntricos, dicéntricos más anillos y acéntricos por célula del análisis de los tubos de sangre sin irradiar y en ausencia o presencia de EEP ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) no existen diferencias.

En la tabla 4.8 se pueden observar los resultados obtenidos para cada experimento. Tras la irradiación a 2 Gy en presencia de etanol al 95% y en ausencia de EEP no existe una disminución significativa ni en la frecuencia de dicéntricos, ni para acéntricos más anillos y ni para acéntricos (0.29 ± 0.03 a 0.25 ± 0.024 , 0.32 ± 0.03 a $0.26 \pm$

0.025 y 0.23 ± 0.02 a 0.22 ± 0.023 , respectivamente). Sasaki *et al.* (1977) observaron que al irradiar linfocitos de sangre periférica a 3 Gy de rayos γ , en presencia de concentraciones crecientes de etanol, la protección máxima para la frecuencia de dicéntricos y anillos se dió a la concentración de 1 M (Molar). Los resultados mostraron que el daño relacionado con la formación de alteraciones tipo intercambio fue protegido eficientemente, y que del orden de un 60% de este daño se debía al efecto indirecto de la radiación ionizante. A pesar de conocer las propiedades radioprotectoras del etanol, pudimos comprobar que el volumen de etanol al 95% añadido a la sangre antes de irradiar (250 μ l, 0.3 M) no disminuía la frecuencia de las distintas alteraciones cromosómicas. Por tanto, sin variar este volumen a añadir para evitar la influencia del etanol en nuestro estudio, se fueron modificando las concentraciones de EEP.

Al comparar los resultados obtenidos al añadir el EEP una hora después de irradiar con 2 Gy con los obtenidos al irradiar una hora antes también a 2 Gy y en ausencia de EEP, no se observa ninguna variación en la frecuencia de las distintas anomalías consideradas.

Si añadiendo el EEP después de irradiar, se observase una reducción en la frecuencia de alteraciones cromosómicas, la hipótesis sería que el mecanismo que estaría teniendo lugar es la apoptosis de las células dañadas por la radiación. Los puntos de control del ciclo celular que se encuentran entre las fases G_0 y M se activarían por el EEP e inducirían la detención del ciclo celular. En nuestros resultados no hemos observado una reducción en la frecuencia de alteraciones cromosómicas cuando añadimos el EEP después de irradiar, por lo tanto no se ha producido apoptosis.

Cuando comparamos los resultados correspondientes a la dosis de 2 Gy sin EEP con los obtenidos en la irradiación a la misma dosis en presencia de EEP, observamos una reducción significativa de la frecuencia de dicéntricos por célula de 0.29 ± 0.03 a 0.16 ± 0.02 ($p < 0.01$). Esta reducción en la frecuencia también la observamos para dicéntricos más anillos (de 0.32 ± 0.03 a 0.18 ± 0.02) ($p < 0.01$), y para acéntricos (de 0.23 ± 0.02 a 0.17 ± 0.02 , $p < 0.05$).

A la dosis de 5 Gy y tras incorporar el EEP antes de irradiar se observa una disminución, con respecto a la irradiación a 5 Gy sin EEP, tanto para dicéntricos (1.34 ± 0.10 vs 0.94 ± 0.09 , $p < 0.01$), como para dicéntricos más anillos (1.45 ± 0.11 vs 0.94 ± 0.09 , $p < 0.01$). Sin embargo, para acéntricos existe una disminución si bien no es significativa.

Resultados y discusión

Modalidad		EEP [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	N	N° alt.	Tipo de alt.	Y \pm SE	
0 Gy	control	0	2030	1	Dic	0.001 \pm 0.001	
				2	Dic + ani	0.001 \pm 0.001	
				7	Ace	0.01 \pm 0.01	
	Con EEP	1000	1000	1	Dic	0.001 \pm 0.001	
				1	Dic + ani	0.001 \pm 0.001	
				7	Ace	0.007 \pm 0.003	
1 hora antes de irradiar	2 Gy	control	440	127	Dic	0.29 \pm 0.03	
				142	Dic + ani	0.32 \pm 0.03	
				103	Ace	0.23 \pm 0.02	
		Etanol 95%	0	411	101	Dic	0.25 \pm 0.02
					109	Dic + ani	0.26 \pm 0.02
					92	Ace	0.22 \pm 0.02
	Con EEP	1000	649	101	Dic	0.16 \pm 0.02	
				114	Dic + ani	0.18 \pm 0.02	
				113	Ace	0.17 \pm 0.02	
	5 Gy	control	0	119	159	Dic	1.34 \pm 0.10
					173	Dic + ani	1.45 \pm 0.11
					124	Ace	1.04 \pm 0.09
Con EEP		1000	108	101	Dic	0.94 \pm 0.09	
				112	Dic + ani	1.04 \pm 0.10	
				104	Ace	0.96 \pm 0.09	
1 hora después de irradiar	2 Gy	Con EEP	1000	325	100	Dic	0.31 \pm 0.03
					103	Dic + ani	0.32 \pm 0.03
					64	Ace	0.20 \pm 0.02

Tabla 4.8: Frecuencias de dicéntricos, dicéntricos más anillos y acéntricos por célula sin irradiar y tras las irradiaciones preliminares a 2 y 5 Gy. Irradiaciones llevadas a cabo en ausencia de EEP o distintas concentraciones de EEP y etanol al 95% (N: número de células analizadas y N° alt: número de alteraciones totales).

Cuando analizamos los resultados correspondientes a la modificación de la modalidad de irradiación, las disminuciones de las frecuencias se observaron cuando se añadió el EEP antes de irradiar y no una hora después de irradiar. Los radioprotectores son sustancias cuyo mecanismo de acción es principalmente el secuestro de radicales libres. Estos radicales libres se forman por acción indirecta tras interaccionar la radiación ionizante con la materia. Por lo tanto, para evitar el efecto dañino de estos radicales los radioprotectores deben estar presentes durante la irradiación.

4.2.2 Evaluación de la influencia de la concentración del EEP.

En el estudio del efecto de la concentración, se irradiaron muestras de sangre periférica a la dosis de 2 Gy, en presencia de EEP a distintas concentraciones, de 0 a 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. En la tabla 4.9 se puede observar para cada concentración de EEP el número de células analizadas así como las distintas alteraciones cromosómicas detectadas.

En las tablas 4.10, 4.11 y 4.12 se muestran las distribuciones de dicéntricos, dicéntricos más anillos y acéntricos por célula respectivamente, el valor del índice de dispersión y la unidad normalizada de este índice, a las distintas concentraciones de EEP tras irradiar a 2 Gy.

EEP [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	N	Dic	Ani	Ace	Otr.	Ctb	Gaps	NA
0	302	100	6	55	8	1	2	172
20	438	102	4	87	7	3	1	204
40	462	100	10	98	10	1	9	228
120	379	78	7	85	5	1	2	178
250	509	102	9	93	8	3	5	220
500	528	100	4	98	7	-	2	211
750	554	101	6	141	8	1	5	262
1000	649	101	13	113	16	2	8	253
2000	590	97	5	124	6	-	2	234

Tabla 4.9: Resultados citogenéticos obtenidos tras irradiación a diferentes concentraciones de EEP y a una dosis de rayos gamma de 2 Gy (N: número total de células; Dic, dicéntricos; Ani, anillos; Ace, acéntricos; Otr: otros, incluye translocaciones, inversiones etc; Ctb: rotura de cromátidas incluyendo radiales; Gaps de cromosoma y cromátida; NA: número de alteraciones totales).

EEP [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Dic	Cél. con 0 Dic	Cél con 1 Dic	Cél con 2 Dic	ID	<i>U</i>
0	100	216	72	14	0.95	- 0.59
20	102	346	82	10	0.97	- 0.51
40	100	370	84	8	0.95	- 0.83
120	78	308	64	7	0.98	- 0.33
250	102	412	92	5	0.90	- 1.61
500	100	436	84	8	0.97	- 0.45
750	101	458	91	5	0.92	- 1.36
1000	101	556	85	8	1.00	0.08
2000	97	501	81	8	1.00	0.04

Tabla 4.10: Para cada concentración de EEP y tras irradiar a 2 Gy, distribución de dicéntricos (Dic) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (*U*).

EEP [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Dic + ani	Cél. Con 1 Dic+Ani	Cél. Con 1 Dic+Ani	Cél. Con 2 Dic+Ani	ID	<i>U</i>
0	106	210	78	14	0.92	- 1.03
20	106	342	86	10	0.95	- 0.76
40	110	360	94	8	0.91	- 1.38
120	85	301	71	7	0.94	- 0.79
250	111	403	101	5	0.87	- 2.02
500	104	432	88	8	0.96	- 0.67
750	107	452	97	5	0.90	-1.64
1000	114	543	98	8	0.97	- 0.61
2000	102	496	86	8	0.99	- 0.25

Tabla 4.11: Para cada concentración de EEP y tras irradiar a 2 Gy, distribución de dicéntricos más anillos (Dic + Ani) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (*U*). En negrita valor de *U* menor a 1.96.

EEP [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Ace	Cél. con 0 Ace	Cél. con 1 Ace	Cél. con 2 Ace	Cél. con 3 Ace	ID	<i>U</i>
0	55	253	43	6		1.04	0.49
20	87	364	62	11	1	1.13	1.87
40	98	372	82	8		0.95	- 0.71
120	85	307	60	11	1	1.11	1.49
250	93	423	80	5	1	0.99	- 0.14
500	98	448	64	14	2	1.22	3.67
750	141	429	111	12	2	1.00	0.04
1000	113	546	94	8	1	1.02	0.40
2000	124	476	105	8	1	0.97	- 0.54

Tabla 4.12: Para cada concentración de EEP y tras irradiar a 2 Gy, distribución de acéntricos (Ace) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (*U*). En negrita valor de *U* mayor a 1.96.

Si analizamos los datos de la unidad normalizada U de las tablas 4.10, 4.11 y 4.12, éstos están mayoritariamente comprendidos entre el intervalo ± 1.96 . Los resultados indican que no se puede rechazar la hipótesis de que la distribución siga una *Poisson* para ninguna de las anomalías consideradas.

En la tabla 4.13 se puede observar para cada concentración de EEP la frecuencia (\pm SE) de dicéntricos, dicéntricos más anillos, acéntricos y el total de anomalías cromosómicas. La frecuencia de dicéntricos muestra una disminución significativa ($p < 0.01$) de unos 30 dicéntricos por 100 células a valores de 15 dicéntricos por 100 células a las concentraciones de 1000 y 2000 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Resultados similares se pueden observar cuando se consideran conjuntamente los dicéntricos y los anillos. La frecuencia de acéntricos permanece constante (aproximadamente 20 acéntricos en 100 células). Para el total de alteraciones se observa una disminución a medida que aumenta la concentración de EEP, esta disminución es estadísticamente significativa a partir de la concentración de 250 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($p < 0.01$ a 250, 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, y $p < 0.05$ a 750 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Para evaluar la fracción protegida máxima, las frecuencias observadas de las distintas anomalías se ajustan a una función exponencial negativa. Las curvas obtenidas para dicéntricos (1) y dicéntricos más anillos (2) son:

$$Y(C)/Y(0) = (0.557 \pm 0.028) + (0.443 \pm 0.028) \exp^{(-46.14 \pm 16.41) C} \quad (1)$$

$$Y(C)/Y(0) = (0.563 \pm 0.028) + (0.437 \pm 0.028) \exp^{(-47.59 \pm 17.23) C} \quad (2)$$

Para evaluar si cada coeficiente explica la función (1 y 2) se realizaron 2 ajustes, el correspondiente al paquete matemático MATLAB con un valor de coeficiente de correlación de 0.886 (dicéntricos) y 0.884 (dicéntricos más anillos) cercano a uno, es decir con una buena bondad en el ajuste. El segundo ajuste está basado en la *t-student* donde $t = \text{coeficiente/error}$. Los valores de F_{np} , F_p y γ son mayores que 2.36 para una *t-student* con 7 grados de libertad, por lo tanto explican la curva.

Los valores de la χ^2 son 6.34 para dicéntricos y 6.82 para dicéntricos más anillos. Ambos valores son menores al valor de 14.07 de la χ^2 con 7 grados de libertad ($p < 0.05$); por lo tanto, podemos decir que la función exponencial obtenida tanto para dicéntricos como para dicéntricos más anillos se ajusta a los valores observados.

Utilizando el método de máxima probabilidad, observamos en nuestros resultados que la protección máxima observada utilizando el EEP como radioprotector es aproximadamente de un 44%.

En las figuras 4.4 y 4.5 se representan las frecuencias observadas y esperadas ajustando los datos a una curva exponencial negativa.

EEP [$\mu\text{g/ml}$]	N	Dic	Y \pm SE	Dic + Ani	Y \pm SE	Ace	Y \pm SE	NA	Y \pm SE
0	302	100	0.33 \pm 0.032	106	0.351 \pm 0.033	55	0.18 \pm 0.025	172	0.57 \pm 0.04
20	438	102	0.23 \pm 0.023	106	0.242 \pm 0.023	87	0.20 \pm 0.023	204	0.47 \pm 0.03
40	462	100	0.22 \pm 0.021	110	0.238 \pm 0.022	98	0.21 \pm 0.021	228	0.49 \pm 0.03
120	379	78	0.21 \pm 0.023	85	0.224 \pm 0.024	85	0.22 \pm 0.026	178	0.47 \pm 0.03
250	509	102	0.20 \pm 0.019	111	0.218 \pm 0.019	93	0.18 \pm 0.019	220	0.43 \pm 0.03
500	528	100	0.19 \pm 0.019	104	0.197 \pm 0.019	98	0.19 \pm 0.021	211	0.40 \pm 0.03
750	554	101	0.18 \pm 0.017	107	0.193 \pm 0.018	141	0.25 \pm 0.021	262	0.47 \pm 0.03
1000	649	101	0.16 \pm 0.016	114	0.176 \pm 0.016	113	0.17 \pm 0.017	253	0.39 \pm 0.02
2000	590	97	0.16 \pm 0.017	102	0.173 \pm 0.017	124	0.21 \pm 0.019	234	0.40 \pm 0.03

Tabla 4.13: Para cada concentración de EEP y tras irradiar a 2 Gy, número de células analizadas (N), frecuencia (\pm error estándar) por célula de dicéntricos (Dic), frecuencia (\pm error estándar) por célula de dicéntricos más anillos (Dic + Ani), frecuencia (\pm error estándar) por célula de acéntricos (Ace) y número de alteraciones totales (NA).

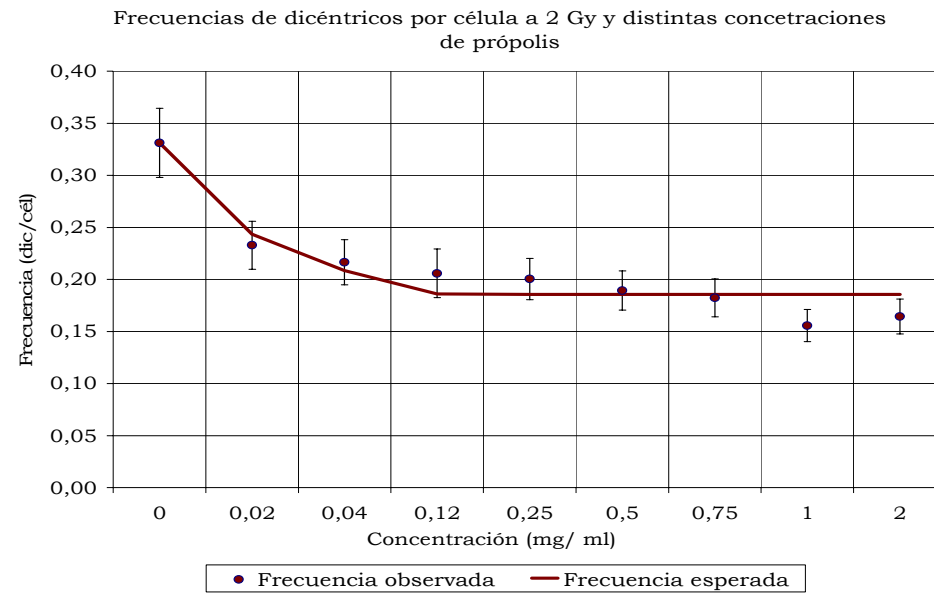


Figura 4.4: Gráfica que representa la frecuencia de dicéntricos por célula a la dosis de 2 Gy y distintas concentraciones de EEP.

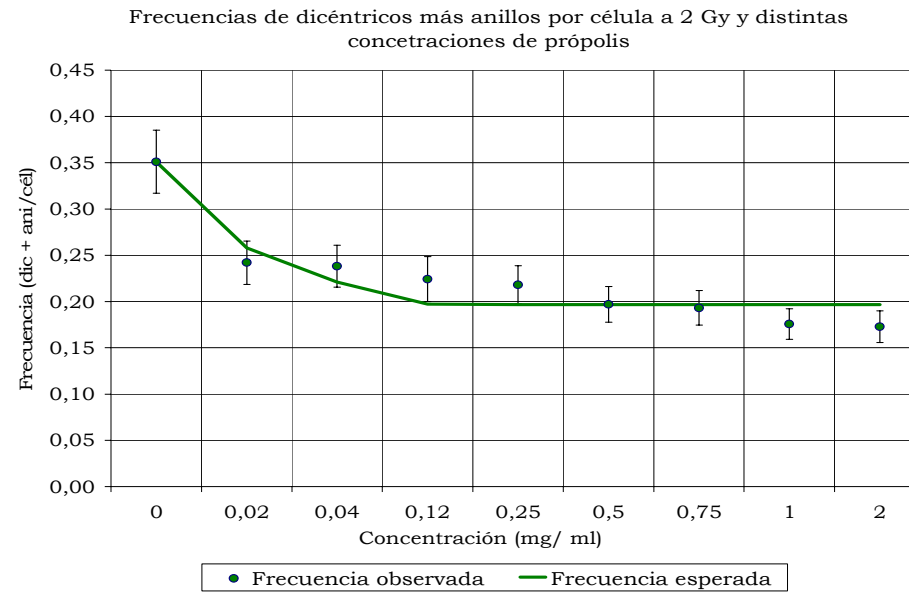


Figura 4.5: Gráfica que representa la frecuencia de dicéntricos más anillos por célula a la dosis de 2 Gy y distintas concentraciones de EEP.

Como se muestra en ambas figuras, la reducción de la frecuencia de dicéntricos y dicéntricos más anillos por célula cuando irradiamos la sangre a 2 Gy de radiación gamma y a distintas concentraciones de EEP parece llegar a un máximo a partir de la concentración de 120 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

En la bibliografía encontramos, para otros radioprotectores químicos, cual es la protección máxima con el incremento de la concentración. Dentro de los radioprotectores compuestos, con grupos alcohol (metanol, etanol, isopropanol, t-butanol, etilenglicol y glicerol) y compuestos con grupos sulfhidrilo (SH) como la cisteína, la cisteamina y el mercaptoetanol, Sasaki *et al.* (1977) encuentran una protección máxima para los grupos alcohol de un 59%, y para los grupos SH de un 80%. Estos autores asumen que la radioprotección está relacionada directamente con la acción indirecta de la radiación ionizante.

Otros compuestos químicos como el dimetil sulfóxido (DMSO) que a una concentración de 1 M poseen una fracción de protección máxima de un 70% (Littlefield *et al.*, 1988, Vijayalaxmi *et al.*, 1995). La forma activa de la amifostina (WR-1065) muestra una protección máxima a la concentración de 4 mM (Littlefield *et al.*, 1993).

La melatonina, un producto secretado por la glándula pineal en el cerebro humano, posee también efecto radioprotector máximo a la concentración de 2 mM, con una reducción de anomalías tipo cromosoma de un 62 % para células anormales, un 68% para aberraciones tipo intercambio (incluye anillos, dic/tri/tetracéntricos) y un 67.8 % para acéntricos extra (Vijayalaxmi *et al.*, 1995).

Dentro de los extractos naturales de plantas con efecto radioprotector evaluado con estudios citogenéticos (micronúcleos) encontramos el trabajo de Jagetia *et al.* (2002) que utiliza distintas concentraciones de extractos de la hoja de dos especie de la familia de las *Mirtaceas*, *Syzygium cumini* y *Eugenia cumini*. Los autores encuentran que a la concentración de $12.5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, la frecuencia de micronúcleos se reduce 3.6 veces respecto del control. En otro estudio evaluando extractos de *Ginseng* (Lee *et al.*, 2005), se observó una reducción de un 46.5% en la frecuencia de micronúcleos con una concentración de $2000 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

4.3. Evaluación del efecto radioprotector del EEP a distintas dosis de radiación.

Para evaluar la eficacia radioprotectora del extracto etanólico de EEP a distintas dosis de radiación, se elaboró una curva de calibración dosis–respuesta, a una concentración conocida de EEP de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

La curva de calibración para evaluar la eficacia radioprotectora del EEP se realizó con 5 dosis de radiación (0.25, 0.5, 1, 2 y 5 Gy).

Para la realización de la curva, se analizaron 4396 células. Los resultados citogenéticos que se obtuvieron aparecen en la tabla 4.14.

Dosis (Gy)	N	Dic	Ani	Ace	Otros	Ctb	Gaps	NA
0	1000	1	0	7	1	5	5	19
0.25	1002	7	1	28	2	4	1	43
0.50	824	20	3	38	4	2	3	70
1.00	813	38	6	81	8	2	1	136
2.00	649	101	13	113	16	2	8	253
5.00	108	101	11	104	12	-	1	229

Tabla 4.14: Resultados citogenéticos obtenidos tras irradiación a diferentes dosis de rayos γ y una concentración de EEP de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (N: células analizadas; Dic, dicéntricos; Ani, anillos; Ace, acéntricos; Otros, incluye translocaciones, inversiones etc; Ctb, rotura de cromátidas; NA: número de alteraciones totales).

Una vez realizado el contaje y clasificadas las alteraciones cromosómicas, estudiamos si la distribución de dicéntricos por célula, a las distintas dosis de radiación y una concentración de EEP de $1000 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, sigue una distribución de *Poisson*.

Las tablas 4.15, 4.16 y 4.17 muestran la distribución de dicéntricos, dicéntricos más anillos y acéntricos por célula para cada dosis de radiación, con muestras no tratadas y tratadas con $1000 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de EEP.

Dosis (Gy)	Dic	Cél. con 0 Dic	Cél. con 1 Dic	Cél. con 2 Dic	Cél. con 3 Dic	Cél. con 4 Dic	ID	U
0.00	1	999	1	-	-	-	1.00	-
0.25	7	995	7	-	-	-	0.99	- 0.14
0.50	20	804	20	-	-	-	0.98	- 0.48
1.00	38	775	38	-	-	-	0.95	- 0.93
2.00	101	556	85	8	-	-	1.00	0.08
5.00	101	37	49	16	4	2	0.86	- 0.99

Tabla 4.15: Para cada dosis de irradiación y una concentración de EEP de $1000 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, distribución de dicéntricos (Dic) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (U).

Dosis (Gy)	Dic + Ani	Cél. Con 0 (Dic + Ani)	Cél. Con 1 (Dic + Ani)	Cél. Con 2 (Dic + Ani)	Cél. Con 3 (Dic + Ani)	Cél. Con 4 (Dic + Ani)	I.D	<i>U</i>
0	1	999	1				1.00	-
0.25	8	994	8				0.99	- 0.17
0.5	23	801	23				0.97	- 0.55
1	44	769	44				0.95	- 1.08
2	114	543	98	8			0.97	- 0.61
5	112	27	58	17	4	2	0.70	- 2.19

Tabla 4.16: Para cada dosis de irradiación y una concentración de EEP de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, distribución de dicéntricos más anillos (Dic + Ani) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (*U*). En negrita valor de *U* menor a 1.96.

Dosis (Gy)	Ace	Cél. con 0 Ace	Cél. con 1 Ace	Cél. con 2 Ace	Cél. con 3 Ace	Cél. con 4 Ace	Cél. con 5 Ace	ID	<i>U</i>
0	7	993	7					0.99	- 0.14
0.25	28	975	26	1				1.04	1.01
0.5	38	788	34	2				1.06	1.24
1	81	735	75	3				0.98	- 0.49
2	113	546	94	8	1			1.02	0.40
5	104	44	37	19	5	1	2	1.20	1.48

Tabla 4.17: Para cada dosis de irradiación y una concentración de EEP de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, distribución de acéntricos (Ace) por célula (Cél), índice de dispersión (ID) y unidad normalizada de este índice (*U*).

Resultados y discusión

Dosis (Gy)	N	Dic	Y ± SE	Dic + ani	Y ± SE	Ace	Y ± SE	NA	Y ± SE
Sin EEP									
0	2030	2	0.001±0.001	2	0.001±0.001	7	0.003±0.001	16	0.008±0.002
0.25	1502	14	0.009±0.002	15	0.01±0.01	37	0.02±0.01	59	0.04±0.01
0.5	1501	49	0.03±0.01	54	0.04±0.01	58	0.04±0.01	129	0.09±0.01
1	962	101	0.10±0.01	107	0.11±0.01	101	0.10±0.01	244	0.25±0.02
2	440	127	0.29±0.03	142	0.32±0.03	103	0.23±0.02	261	0.59±0.04
5	119	159	1.34±0.10	173	1.45±0.11	124	1.04±0.09	323	2.71±0.15
Con EEP									
0	1000	1	0.001±0.001	1	0.001±0.001	7	0.007±0.003	19	0.019±0.004
0.25	1002	7	0.007±0.003	8	0.01±0.01	28	0.03±0.01	43	0.04±0.01
0.5	824	20	0.02±0.01	23	0.03±0.01	38	0.05±0.01	70	0.08±0.01
1	813	38	0.05±0.01	44	0.05±0.01	81	0.10±0.01	136	0.17±0.01
2	649	101	0.16±0.02	114	0.18±0.02	113	0.17±0.02	253	0.39±0.02
5	108	101	0.94±0.09	112	1.04±0.10	104	0.96±0.09	229	2.12±0.14

Tabla 4.18: Frecuencias de dicéntricos, dicéntricos más anillos, acéntricos y número de alteraciones totales (NA) por célula, para las muestras control y las muestras a una concentración de 1000 µg/ml, irradiadas a 0.25, 0.5, 1, 2 y 5 Gy.

Los valores de las tablas 4.15, 4.16 y 4.17 indican que mayoritariamente la distribución por célula de las distintas anomalías sigue una distribución de *Poisson* (valores de U comprendidos en el intervalo ± 1.96) solo para dicéntricos más anillos y a la dosis de 5 Gy se observó una ligera sobredispersión.

Las frecuencias de las alteraciones consideradas aparecen en la tabla 4.18. Para comparar, la tabla también muestra los resultados citogenéticos obtenidos tras irradiar a la misma dosis sin EEP. En todas las dosis de radiación, la frecuencia de dicéntricos es inferior en las muestras tratadas con EEP, siendo esta diferencia estadísticamente significativa a partir de 1 Gy ($p < 0.01$ para 1, 2 y 5 Gy). Resultados similares se obtienen al considerar conjuntamente los cromosomas dicéntricos más anillos. Para fragmentos acéntricos sólo a la dosis de 2 Gy existe una disminución significativa ($p < 0.05$). Para el total de alteraciones esta diferencia es estadísticamente significativa a partir de 1 Gy ($p < 0.01$ para 1, 2 y 5 Gy).

Cabe destacar que a la dosis de 0 Gy, tanto para fragmentos acéntricos como para el número de alteraciones totales (NA) hay un incremento significativo de las frecuencias en las muestras tratadas con EEP ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Esto indica que el EEP tiene un leve efecto clastogénico (generador de roturas en el ADN).

Las radiaciones pueden provocar diferentes tipos de daño en el ADN. Las alteraciones cromosómicas observadas las clasificamos de tipo cromosoma o de tipo cromátida. El daño cromosómico puede inducir alteraciones tipo intercambio, nuestros resultados han mostrado una reducción en las frecuencias de dicéntricos y anillos, o sea que el EEP protege del daño cromosómico de tipo intercambio. Cuando

consideramos el número de alteraciones totales (NA), también consideramos las fragmentos acéntricos extra y el daño cromatídico. Para el número total de alteraciones no existe una disminución clara, incluso a 0 Gy con EEP se incrementa levemente el NA. Se observa un incremento del daño cromosómico debido a únicas roturas (acéntricos) y del daño cromatídico (El NA considera el total de alteraciones producidas por los dos tipos de daño).

Esta ineficacia en la protección frente a los fragmentos acéntricos extra y al daño cromatídico, podría explicarse por dos motivos. El primero es que el EEP reduce el daño producido por las trayectorias de ionización, por el efecto secuestrador de radicales libres, reduciendo la posibilidad de que concurren tanto trayectorias únicas como dos trayectorias de ionización en el espacio y tiempo. Y el segundo implicaría la inhibición de la enzima topoisomerasa I (Boege *et al.*, 1996). La inhibición de esta enzima induce incremento de SSB (roturas simples de la cadena de ADN).

Los coeficientes de las curvas para dicéntricos y dicéntricos más anillos tratadas con el extracto etanólico de EEP se indican en la tabla 4.19.

	Dicéntricos	Dicéntricos más anillos
C	$(0.11 \pm 0.10) 10^{-2}$	$(0.11 \pm 0.10) 10^{-2}$
α	$(1.85 \pm 0.71) 10^{-2}$	$(2.28 \pm 0.75) 10^{-2}$
β	$(3.16 \pm 0.39) 10^{-2}$	$(3.48 \pm 0.42) 10^{-2}$

Tabla 4.19: Valores de los coeficientes C, α y β de la función $Y = C + \alpha D + \beta D^2$, y su error estándar de las curvas dosis – efecto para dicéntricos y dicéntricos más anillos tratadas con EEP.

En este caso el valor de la χ^2 con 3 grados de libertad fue de de 2.66 y 2.82, para dicéntricos y dicéntricos más anillos respectivamente, menor que el valor 7.81 (χ^2 , con un 95% de confianza). Los coeficientes obtenidos se indican en la tabla 4.19. Los resultados indican un buen ajuste de los valores observados. Cuando comparamos los coeficientes lineal y cuadrático de la curva para dicéntricos con el obtenido en la curva de calibración control ($Y = 0.07 \pm 0.06 \times 10^{-2} + (4.13 \pm 0.58 \times 10^{-2})D + (4.44 \pm 0.33 \times 10^{-2})D^2$) se observa una reducción de estos índices del orden de un 50% el coeficiente lineal y del orden de un 30% el cuadrático.

Cuando se evalúa si los distintos coeficientes obtenidos explican la curva, en la curva de calibración con EEP, tanto para dicéntricos como dicéntricos más anillos los valores de la *t-student* (coeficiente/error) para el coeficiente C y α son, 1.1 y 2.6 respectivamente, inferiores a 4.19 y por tanto en este caso indican que los coeficientes no explicarían la curva. El valor del coeficiente β , con una *t-student* de 8.10 superior a 4.19, si explica la curva. Cabe señalar que aunque los valores observados tras la irradiación en presencia de EEP se podrían ajustar a otro tipo de función, estos se han ajustado a la lineal cuadrática que es la característica para este tipo de análisis.

Las curvas dosis - efecto con y sin EEP para dicéntricos y dicéntricos más anillos se representan en la figura 4.6 y 4.7 respectivamente.

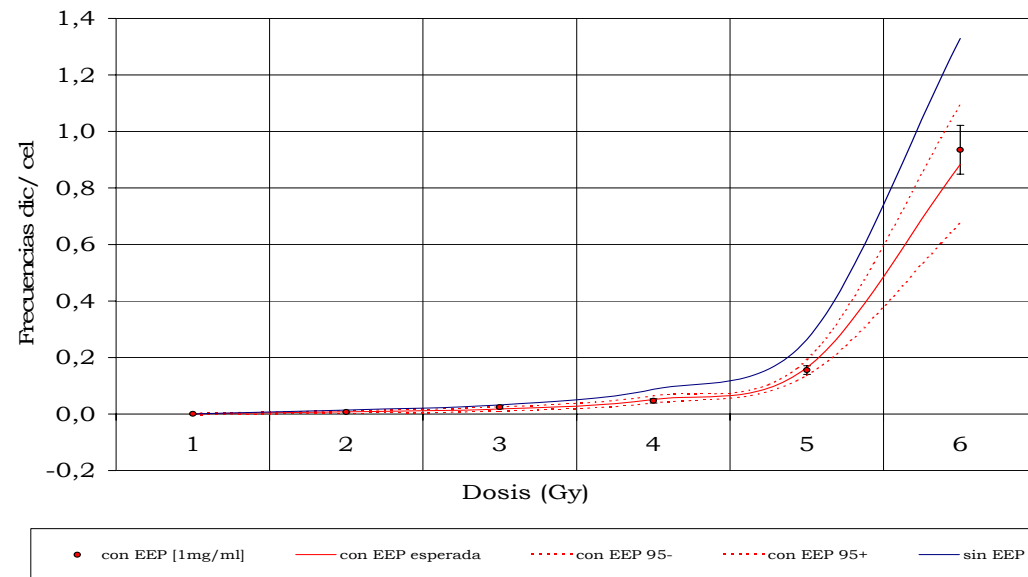


Figura 4.6: Curvas dosis – efecto para rayos gamma con EEP ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y sin EEP de las frecuencias observadas y esperadas de dicéntricos, su correspondiente error y los límites al 95%.

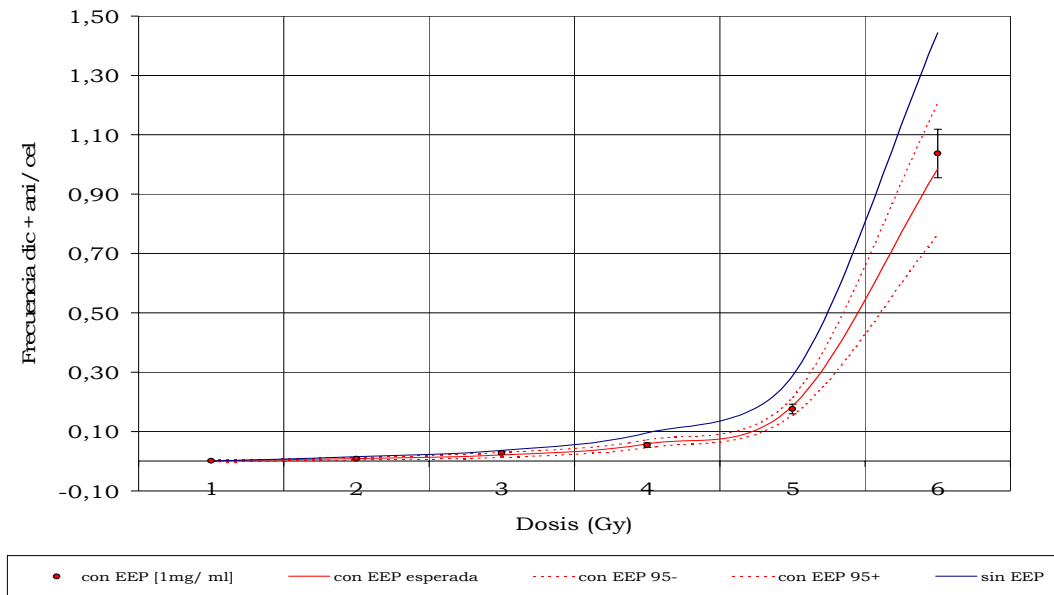


Figura 4.7: Curvas dosis – efecto para rayos gamma con EEP ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y sin EEP, de las frecuencias observadas y esperadas de dicentricos más anillos, su correspondiente error y los límites al 95%.

Las hipótesis propuestas del efecto radioprotector observado, cuando se cultivan e irradian linfocitos de sangre periférica a distintas dosis de radiación y distintas concentraciones del extracto, son:

La primera hipótesis es que el EEP puede proteger directamente contra el daño cromosómico, tipo intercambio, mediante el secuestro de radicales libres generados por la radiación ionizante.

La segunda hipótesis sería que el EEP puede activar enzimas implicados en la reparación del daño producido por el estrés oxidativo.

Cuando comparamos las frecuencias de las alteraciones sin irradiar y en presencia y ausencia de EPP ($1000\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), el EEP incrementa la frecuencia de acéntricos y el número de alteraciones totales.

La mayor eficacia de un radioprotector frente a otro podría deberse a varios mecanismos:

- Que el radioprotector sea más selectivo en el secuestro de radicales libres.
- Y además actuar como antioxidante.

Este es el caso de la melatonina que es capaz de secuestrar radicales hidroxilo, peroxilo y aniones peroxinitrito y activar la glutatión peroxidasa (mecanismo celular de defensa enzimático antioxidativo) que reduce la formación de radicales hidroxilo porque metaboliza al precursor (H_2O_2). A pesar de ser menos eficaz en la radioprotección que la amifostina (protección de un 68% *vs* 87% para dicéntricos, respectivamente), la doble capacidad de la melatonina podría explicar que de los radioprotectores estudiados es el único capaz de

reducir la frecuencia de acéntricos extra. Además la melatonina podría facilitar una reparación eficiente de las primeras roturas de la cadena de ADN antes de que se produzca daño cromosómico (Vijayalazmi *et al.*, 1998).

4.4 Índice mitótico e índice de proliferación celular

El siguiente estudio que se ha llevado a cabo es la evaluación del efecto del EEP en el ciclo de división celular.

Se ha publicado que el EEP inhibe el crecimiento de una variedad de células neoplásicas, particularmente de tumores mamarios (Padmavathi *et al.*, 2006), de colon (Shimizu *et al.*, 2005), de pulmón (Orsolich *et al.*, 2005), etc. en estudios *in vivo* e *in vitro*. Por este motivo en este punto se lleva a cabo el estudio del efecto en la cinética celular para evaluar la citotoxicidad y/o genotoxicidad del EEP en linfocitos de sangre periférica.

Para ello, utilizamos dos índices, el índice de proliferación celular y el índice mitótico. Evaluamos la cinética del ciclo celular en cultivos de linfocitos, no irradiados, que han sido tratados con distintas concentraciones de EEP (20, 40, 120, 250, 500, 750, 1000 y 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Los primeros resultados que se presentan hacen referencia al índice de proliferación celular (IP) a las distintas concentraciones de EEP en muestras no irradiadas.

Como puede observarse en la tabla 4.20, a partir de la concentración de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ existe una disminución en el IP, aunque esta disminución solo es estadísticamente significativa a partir de la concentración de 750 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($p < 0.01$).

EEP [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]	N	Índice de Proliferación (IP)				
		0 Gy				
		M1	M2	M3	IP \pm SE	IPR
0	110	72	14	24	1.56 \pm 0.08	100
20	139	80	43	16	1.54 \pm 0.06	98.46
40	101	76	13	12	1.37 \pm 0.07	87.38
120	121	84	21	16	1.44 \pm 0.07	91.97
250	116	74	35	7	1.42 \pm 0.06	90.97
500	141	102	17	22	1.43 \pm 0.06	91.62
750	101	90	8	3	1.14 \pm 0.04	72.82
1000	113	99	6	8	1.19 \pm 0.05	76.40
2000	104	100	2	2	1.06 \pm 0.03	67.64

Tabla 4.20: Índice de proliferación celular y su correspondiente error (\pm SE) para distintas concentraciones de EEP (N: células analizadas; M1: metafase en primera división celular; M2: metafase en segunda división celular; M3: metafase en tercera división celular).

Por lo tanto, el EEP altera la habilidad de los linfocitos de responder a la estimulación mitogénica, o a la progresión del ciclo celular. El tratamiento de los linfocitos con EEP reduce la proporción de células que se han replicado.

La figura 4.8 representa los datos correspondientes a la tabla 4.20. La función lineal obtenida ajustada a los valores observados es $y = -0,0002x + 1,4746$, con un coeficiente de regresión de 0,7709.

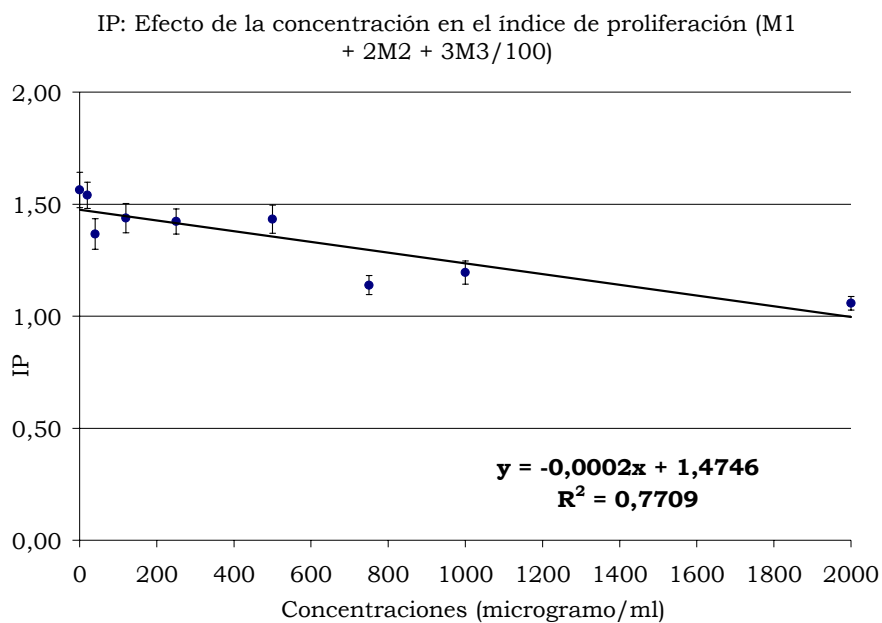


Figura 4.8: Índice de proliferación celular (IP) a distintas concentraciones de EEP sin irradiar.

En la tabla 4.21 se muestran los resultados del efecto del EEP en el índice mitótico (IM) y en la figura 4.9 se representan gráficamente los datos. La función lineal obtenida ajustada a los valores observados es $-0,0013x + 4,3293$, con un coeficiente de regresión de 0,9179. Nuestros resultados demuestran una inhibición del IM, el EEP provoca un decrecimiento del IM de un 60% a la concentración de $2000 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

EEP [$\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$]	N	Núc.	Meta.	IM	IMR
0	1290	55	1235	0.043 \pm 0.006	100
20	1045	45	1000	0.043 \pm 0.006	101
40	1381	56	1325	0.041 \pm 0.005	95.11
120	1407	57	1350	0.041 \pm 0.005	95.02
250	834	34	800	0.041 \pm 0.007	95.62
500	730	30	700	0.041 \pm 0.007	96.39
750	519	19	500	0.037 \pm 0.008	85.86
1000	615	16	599	0.026 \pm 0.006	61.02
2000	539	9	530	0.017 \pm 0.006	39.16

Tabla 4.21: Índice mitótico y porcentaje de inhibición, a distintas concentraciones de EEP (N: células analizadas; Núc.: núcleos; Meta.: metafases; IM: índice mitótico).

En la tabla 4.21 puede observarse que el índice mitótico se ha reducido en todas las concentraciones aunque significativamente ($p < 0.01$) en las concentraciones de 1000 y 2000 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

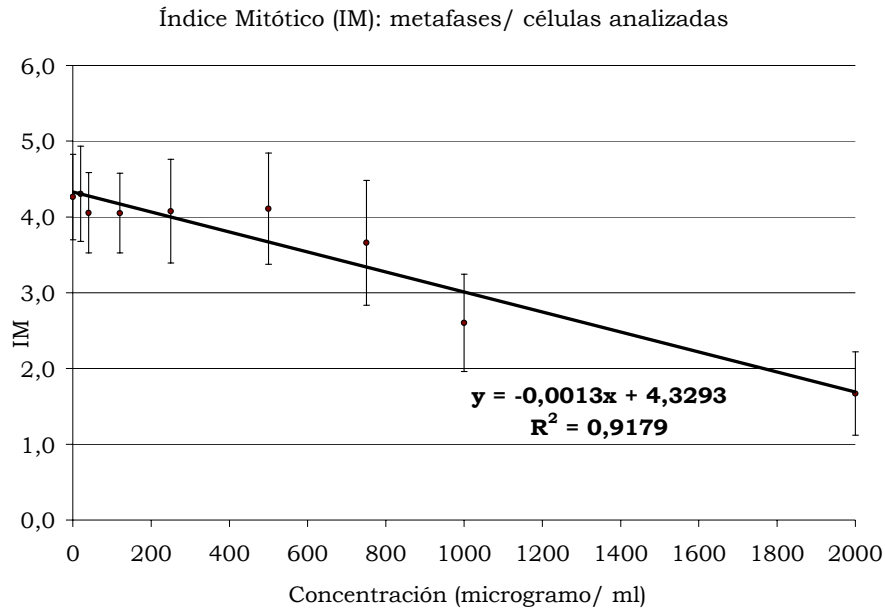


Figura 4.9: Índice mitótico de las distintas concentraciones de EEP sin irradiar.

En el estudio de la actividad antitumoral de compuestos sintéticos o naturales un cribado preclínico generalmente se lleva a cabo evaluando un único parámetro, normalmente la muerte celular. Sin embargo, con el uso de dos indicadores biológicos, como el índice mitótico (IM) y de proliferación celular (IP), se puede obtener una información más precisa. Además una inhibición del IM se puede interpretar en términos de muerte o de detención del ciclo celular en algún momento durante la interfase. Por otro lado, el IP nos permite diferenciar entre sustancias que inducen muerte celular o aquellas que tienen efecto citostático por detención de alguna fase del ciclo celular (Rojas *et al.*, 1993). Nuestros datos indican que linfocitos cultivados en presencia de EEP a concentraciones $\geq 750 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

durante 72 horas, mostraron un decrecimiento del IP concentración-dependiente.

Cuando comparamos los índices relativos, observamos que para la máxima concentración de EEP, el IPR se reduce hasta un 68% (tabla 4.20), mientras que el IMR un 39% (tabla 4.21).

Estos resultados podrían deberse a un bloqueo transitorio de uno o más puntos del ciclo celular. Algunas interpretaciones podrían basarse en el efecto antiproliferativo del EEP en el ciclo celular. Weng *et al.* (2005) observaron que este efecto antiproliferativo de la crisina (componente del EEP) en el ciclo celular era causado por parada en la transición de las fases G₁/S.

En los resultados presentados anteriormente se observa que cuando se irradian los linfocitos a 2 Gy y distintas concentraciones de EEP, la protección máxima (del orden de un 40%) se daba a la concentración de 1000 µg.ml⁻¹. Pero a esta concentración se produce una reducción del IPR de hasta un 76% y hasta un 61% de IMR, siendo el total de inhibición del IPR hasta un 68% y del IMR hasta un 39%. Esto significa que para utilizar el EEP como radioprotector la concentración ideal sería entre 120 y 500 µg.ml⁻¹, donde los índices IM e IP no tienen una reducción significativa.

La correlación entre el IM y el IP puede caracterizar la actividad citostática de determinados agentes, como puede verse en la figura 4.10 la pendiente es negativa y la función lineal ajustada es $y = -0,0072x + 1,4551$, con coeficiente de regresión de 0,7298. Los agentes o sustancias que interaccionan con el ADN muestran una curva de regresión con pendiente negativa (Rojas *et al.*, 1993).

El EEP no es eficiente en la protección contra la radiación en relación a la perturbación en la progresión del ciclo celular y no provee una protección concentración-dependiente, al contrario al aumentar la concentración disminuye tanto el IP como el IM.

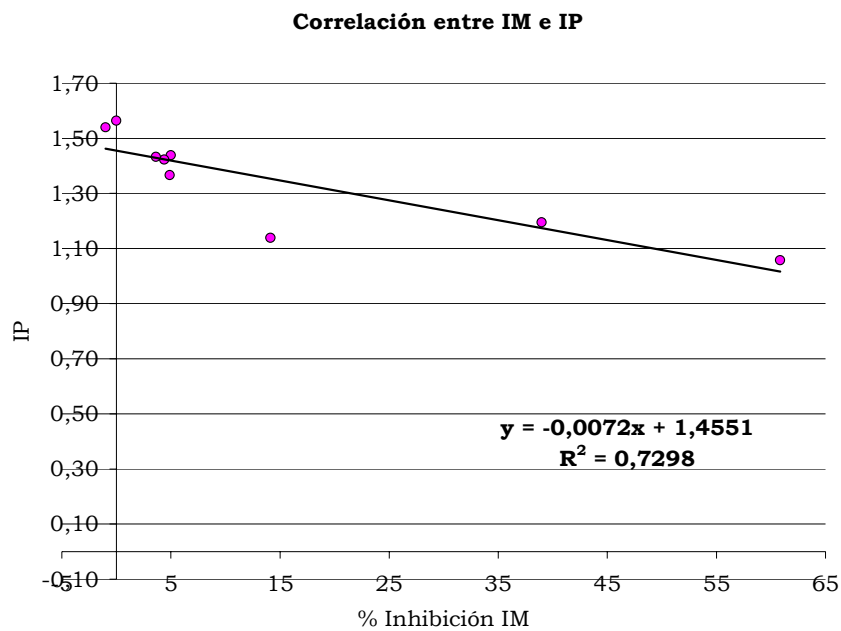


Figura 4.10: Correlación entre el índice de proliferación y la inhibición del índice mitótico, a distintas concentraciones de EEP.

Por último, si comparamos la reducción de estos índices con los descritos por otros autores utilizando otros compuestos, encontramos una reducción similar a nuestros resultados cuando se utilizan concentraciones de melatonina ≥ 20 mM (Vijayalaxmi *et al.*, 1995). En este estudio los autores observan un decrecimiento dependiente de la concentración. Recientemente, Gadano *et al.* (2006) publicó que extractos de Paico, una planta utilizada en medicina natural, decrecía el IM pero no modificaba el IP.

Capítulo 5. Conclusiones y líneas futuras

5. CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS.

5.1 Conclusiones.

Seguidamente se resumen las conclusiones más destacadas de la presente tesis:

En la presente tesis se pretende demostrar la capacidad del EEP de disminuir significativamente el daño cromosómico inducido por la radiación gamma en células humanas.

1. Hemos obtenido una curva de calibración dosis-respuesta para rayos gamma. Esta curva de calibración, es la primera realizada en la Comunidad Valenciana. Además del uso que de ella se deriva para realizar estudios de Dosimetría Biológica, se ha utilizado para valorar el efecto radioprotector del propóleos.
2. Se ha obtenido un extracto etanólico de propóleos (EEP) miscible con la sangre periférica. El propóleos puro se extrajo con etanol al 95% y se preparó a distintas concentraciones. Conocido el efecto radioprotector del etanol, se comprobó que tras irradiar a una misma dosis de radiación linfocitos humanos en presencia de etanol y ausencia de EEP, que el volumen y molaridad utilizados no modificó las frecuencias de las distintas alteraciones cromosómicas.
3. Se ha evaluado el efecto radioprotector del propóleos a través de una análisis dependiente de la concentración de EEP:

Los resultados obtenidos cuando se irradiaron muestras de sangre periférica a la dosis de 2 Gy, sin EEP y en presencia de EEP a distintas concentraciones muestran, tanto para dicéntricos como para dicéntricos más anillos, una protección máxima frente al daño producido por las radiaciones ionizantes de un 44%.

La frecuencia del número de alteraciones totales disminuye a medida que aumentamos la concentración de EEP. Las frecuencias observadas de las alteraciones cromosómicas se ajustan a una función exponencial negativa, a partir de la concentración de EEP de $120 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ el efecto radioprotector se mantiene, situándonos en el *plateau* de la curva.

En el número de alteraciones totales, consideramos alteraciones de tipo cromosoma como dicéntricos, anillos y acéntricos y alteraciones de tipo cromatídico como cromátidas rotas (ctb) y “gaps”. La frecuencia de acéntricos, ctb y “gaps” permanece constante con el incremento de la concentración. Por lo tanto, para el número de alteraciones totales se observa una disminución significativa a partir de la concentración de EEP de $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

4. En el análisis dependiente de la dosis, el efecto de la irradiación a distintas dosis de radiación, en ausencia y presencia de EEP, varía en función de la alteración cromosómica que evaluemos. La frecuencia de dicéntricos y dicéntricos más anillos es inferior en las muestras tratadas con EEP a partir de la dosis de 1 Gy. Para fragmentos acéntricos sólo a la dosis de 2 Gy se produce una disminución significativa de la frecuencia.

Cuando comparamos los coeficientes obtenidos en las curvas de calibración para las distintas alteraciones cromosómicas en función de la dosis, ambos coeficientes tanto el lineal como el cuadrático se reducen para las curvas de dicéntricos y dicéntricos más anillos. La reducción del coeficiente lineal y cuadrático de la curva de calibración para cromosomas dicéntricos comparada con los coeficientes de la curva control se reducen del orden de un 50% y un 30%, respectivamente.

Cuando comparamos el número de alteraciones totales sin irradiar, en ausencia de EEP y a una concentración de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, observamos un leve efecto clastogénico (generador de roturas en el ADN) del EEP. Esto puede deberse al efecto del EEP en la inhibición de enzimas implicadas en la reparación del ADN, como la topoisomerasa I, cuya inhibición incrementa las roturas simples de cadena del ADN (SSB).

5. Se ha analizado el efecto radioprotector del EEP cuando añadimos el extracto antes y después de irradiar, observándose una disminución de las frecuencias de alteraciones cromosómicas cuando se añadió el EEP antes de irradiar. Esto indica que el mecanismo principal de radioprotección del propóleo es el secuestro de radicales libres, reduciendo la posibilidad de que concurren tanto trayectorias únicas como dos trayectorias de ionización en el espacio y en el tiempo.
6. Para evaluar efectos adversos se ha hecho un estudio del efecto citotóxico del EEP a través de dos tipos de índices, el mitótico y el de proliferación. En ambos análisis se produce una

reducción significativa a partir de concentraciones mayores de $750 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

La actividad citostática del EEP la caracterizamos con la correlación entre ambos índices. Nuestros resultados muestran que al incrementar las concentraciones de EEP en linfocitos humanos no irradiados se obtiene una pendiente negativa entre ambos índices. Esta pendiente negativa tiene lugar en agentes o sustancias que interaccionan con el ADN.

7. Para el uso radioprotector del EEP la franja óptima de concentraciones sería entre $120\text{-}500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. En este rango de concentraciones tenemos una protección máxima frente al daño radioinducido y no muestran un efecto citotóxico en linfocitos humanos no irradiados.

5.2 Líneas futuras de Investigación

La presente tesis ha puesto un punto de partida en la validación de la acción radioprotectora del extracto de propóleos que implicaría la posibilidad de futuras aplicaciones clínicas en pacientes o trabajadores expuestos a radiaciones ionizantes.

Es importante el estudio de sustancias radioprotectoras que tengan la propiedad de secuestrar los radicales libres y proteger a la célula del efecto nocivo de las radiaciones ionizantes. Otras futuras líneas de investigación se podrían basar en estudios de bio-disponibilidad y fármaco-cinética del propóleos, purificación del EEP para obtener una mayor eficacia en la radioprotección, estudios de expresión de

proteínas implicadas en el ciclo de división celular, evaluación de la acción del propóleos en combinación con otros radioprotectores y por último y no menos importante el estudio de la acción antitumoral del propóleos.

5.3 Publicaciones y contribuciones

Comunicaciones internacionales

- Analysis of translocations in stable cells and their implications in retrospective biological dosimetry. *Radiation Research*. 164; 5; 612-617 (2004)
- Biological dosimetry in a group of radiologists by the analysis of dicentric and translocations. *Radiation Research*. 164; 612-617 (2005)
- Assessment by cytogenetic analysis of the radioprotection properties of propóleos extract. *Radiation Protection Dosimetry*. 115; 461-464 (2005)
- Biological dosimetry in a group of radiologist by the analysis of dicentrics and translocations. *Chromosome Research*. 1057; 115. ISSN: 0967-3849 (2005)
- Age is not major indicador of CDKNA2 mutations in melanoma patients. *European Academy of Dermatology and Venerology JEADV*. 18; 193-557 (2004)
- Age does not appear as a major indicator of cdkna2 mutation in melanoma patients in Spain. *Melanoma Research*. 15; 555-558 (2005)

Comunicaciones nacionales

- Elaboración preliminar de la curva de calibración dosis-respuesta para fotones de baja tasa. *Radioprotección*. (ISSN 1133-1717) 1; 222-226 (2002)
- Estudio de exposición crónica en radiólogos intervencionistas expuestos a radiaciones ionizantes mediante. *Radioprotección*. (ISSN); 1-4 (2005)

Congresos Internacionales

- Congreso IRPA 11 “International Congress of the International Radiation Protection Association”. Con el título: Biological dosimetry in an interventional radiologist exposed to ionizing radiations. *IRPA (ISSN 84-87078-05-2)* Madrid (2004)
- Usefulness of the analysis of the unpainted portion in the establishment by FISH of dose -effect curves for retrospective dosimetry. *IRPA (ISSN 84-87078-05-2)* Madrid (2004)
- Comunicación oral, con el título “Assessment of the radioprotection properties of propóleos extract using *in vitro* cultures after gamma irradiation” en el congreso *ICRS 10 – RPS 2004, 21st Century Challenges in radiation Protection and Shielding*, Madeira (2004).
- Congreso IRPA “Second European IRPA Congress on Radiation Protection”. Con el título: Effect of propóleos on mitotic and cellular proliferation incidences in human blood lymphocytes. Paris-Francia (2006)

Congresos Nacionales

- Elaboración preliminar de la curva de calibración dosis respuesta para fotones de baja tasa. IX Congreso de la Sociedad Española de Protección Radiológica. Bilbao 2002
- Detección de mutaciones germinales en CDKN2A en pacientes con melanoma. XXI Congreso Nacional de Genética Humana. Oviedo 2002
- Estudio de exposición crónica en radiólogos intervencionistas expuestos a radiaciones ionizantes. X Congreso de la Sociedad Española de Protección Radiológica. Huelva (2005)
- Comunicación oral con el título: Radioprotectores: nuevas perspectivas. I Jornada sobre Salud Laboral y Radiaciones Ionizantes. Valencia. Marzo 2006. ADEIT. Miembro del comité organizador.
- Comunicación oral con el título:, propiedades radioprotectoras del propóleos. II Congreso Internacional de Apiterapia y Apicultura, Madrid 2006.

Proyectos

- Elaboración de una curva de calibración dosis efecto. *Entidad financiadora* EVES. *Duración desde* 1/2000 *hasta* 12/2000. *Investigador/a principal* JI. Villaescusa *Tipo de participación* A. Montoro Becaria
- Estudio de mutaciones germinales en los genes de las proteínas p15 (CDKN2B *Entidad financiadora* GV00-008-12. IVO. *Duración desde* 1/2000 *hasta* 12/2001. *Investigador/a principal* E. Nagore. *Tipo de participación* A. Montoro Investigadora

- Evaluación del efecto radioprotector del propóleo. *Entidad financiadora* Dietéticos Intersa. *Duración desde* 11/2003 *hasta* 3/2004. Investigador/a principal G. Verdú; A. Montoro
- Evaluación del efecto radioprotector del propóleo. *Entidad financiadora* Dietéticos Intersa. *Duración desde* 1/2005 *hasta* 12/2005. Investigador/a principal G. Verdú; A. Montoro
- Ayuda al grupo mantenimiento y seguridad industrial. *Entidad financiadora* Agencia Valenciana de Ciencia y Tecnología. *Duración desde* 1/1/2003 *hasta* 1/1/2006. *Investigador/a principal* G. Verdú. *Tipo de participación* A. Montoro Becaria
- Desarrollo de nuevas técnicas radiofísicas para el control de equipos de rayos-x (Teracor-x). *Entidad financiadora* Consellería de Empresa, Universitat i Ciencia. *Duración desde* 1/1/2004 *hasta* 1/1/2006. *Investigador/a principal* G. Verdú. *Tipo de participación* A. Montoro Becaria
- Desarrollo de métodos nodales avanzados para la resolución de la ecuación difusión neutrónica. *Entidad financiadora* UPV. Vicerrectorado de Investigación, Desarrollo e Innovación. *Duración desde* 18/7/2003 *hasta* 18/7/2005. *Investigador/a principal* G. Verdú. *Tipo de participación* A. Montoro Investigadora
- Monitorización, diagnóstico y validación de señales de sensores de plantas termoeléctricas. *Entidad financiadora* Ministerio de Ciencia y Tecnología. D.G. de Investigación. *Duración desde* 28/12/2001 *hasta* 28/12/2004. *Investigador/a principal* G. Verdú. *Tipo de participación* A. Montoro Becaria
- Comparación de la calidad de imagen de un mamógrafo digital versus uno convencional. Análisis de dosimetría. *Entidad financiadora*. Conselleria de Sanitat-Dir Gen Per a la Salut Publica. *Duración desde* 1/3/2004 *hasta* 1/9/2004.

Investigador/a principal G. Verdú. *Tipo de participación* A. Montoro Becaria

- Assesment of radiological detriment versus image quality and technical- physic aspects in breast cancer screening programme. *Entidad financiadora.* European network of reference centers for breast cancer screening. *Duración desde* 1/1/2001 *hasta* 31/12/2001. *Investigador/a principal* JI. Villaescusa. *Tipo de participación* A. Montoro Investigadora.
- Radiological risk assesment in a breast cancer screening programme. *Entidad financiadora.* European network of reference centers for breast cancer screening. *Duración desde* 1/1/2001 *hasta* 31/12/2001. *Investigador/a principal* JI. Villaescusa. *Tipo de participación* A. Montoro Investigadora.

Capítulo 6. Bibliografía

6. BIBLIOGRAFÍA

- Arora R, *et al.* 2005. Radioprotection by plant products: present status and future prospects. 19(1):1-22.
- Ban J, *et al.* 1983. Cytostatic effects of propolis *in vitro*. Acta Pharm. Jugosl., 33, 245-255.
- Bankova V, *et al.* 1995. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. Zeitschrift für Naturforschung Section C. Biosciences, 49, 6-10.
- Barquinero JF. 1991. Master en Biología Humana. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Beninson D, *et al.* 1986. Biological Dosimetry: Chromosomal aberration analysis for dose assessment, IAEA Technical Reports Series, N°. 260, Viena.
- Bracho JC, *et al.* 1996. Comparison of isolation methods for propolis volatiles. J. Essent. Oil Res., 8, 665-668.
- Boege F, *et al.* 1996. Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I. J. Biol. Chem. 271(4):2262-70.
- Burdock GA, *et al.* 1998. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis. Food and Chemical Toxicology, 36, 347-363
- Chadwick K H, and Leenhouts, H P. 1978. The rejoining of DNA double-strand breaks and a model for the formation of chromosomal

rearrangements. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 33, 517-529.

Chen CN, *et al.* 2001. The antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL-60 cells. *Anticancer drugs*, 12(2), 143-9.

Chen CN, *et al.* 2004. Comparison of Radical Scavenging Activity, Cytotoxic Effects and Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Taiwanese Propolis from Different Sources. *Evid Based Complement Alternat. Med.*, 1,1(2), 175-185.

Chen CN, *et al.* 2004. Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome c release in human melanoma cells. *Biochem. Pharmacol.*, Jan 1, 67(1),53-66.

Chiao C, *et al.* 1995. Apoptosis and altered redox state induced by CAPE in transformed rat fibroblasts cells. *Cancer Research*, 55(16), 3576-2583.

Chinthalapally V, *et al.* 1992. Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. *Chem. Biol. Interact.*, 16, 84(3), 277-90.

Chinthalapally V, *et al.* 1993. Inhibitory effect caffeic acid esters on Azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon, *Cancer Research*, 53, 4182-4188.

- Dieterich K. 1911. Resin from bee glue (propolis). *Pharm. Ztg* 55771
In German. CA 5: 793.
- Dowd SB, and Tilson ER. 1999. Practical radiation protection
and applied radiobiology. Second edition. W. B. Saunders
Company.
- Edwards A, *et al.* 1979. Radiation induced chromosome aberrations
and the Poisson distribution. *Radiat. Environ. Biophys.*, 30, 16(2),
89-100.
- El-Ghazaly MA, *et al.* 1995. The use of aqueous propolis extract
against radiation induced damage. *Drugs. Exp. Clin. Res.*, 21 (6),
229-36.
- Elsendoorn TJ, *et al.* 2001. Chemotherapy-induced chromosomal
damage in peripheral blood lymphocytes of cancer patients
supplemented with antioxidants or placebo. *Mutat. Res.* 498, 145-
158.
- Farré R, *et al.* 2004. El própolis y la salud. *Ars. Pharmaceutica*, 45,
1, 21-43.
- Frenkel K, *et al.* 1993. Inhibition of tumor promoter-mediated
processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid
phenethyl ester. *Cancer Res.* 1993 Mar 15; 53(6):1255-61.
- Galano AB; *et al.* 2006. Argentine folk medicine: genotoxic effects of
Chenopodiaceae family. *J. Ethnopharmacol.* 16;103: 246-51.
2005 Oct 10.

Ghisalberti EL. 1979. Propolis: a review. *Bee world*, 60, 59-84.

Grunberger D, *et al.* 1988. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*, 15,44(3), 230-2.

Heo MY, *et al.* 2000. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutat. Res.*, 488(2), 135-50.

Hladón B, *et al.* 1980. In vitro studies on the cytostatic Activity of propolis extracts. *Arzneimittelforschung*, 30, 1847-1848.

Jagetia GC, *et al.* 2002. *Syzygium cumini* (Jamun) reduces the radiation-induced DNA damage in the cultured human peripheral blood lymphocytes: a preliminary study. *Toxicol. Lett.* 7; 132(1):19-25.

Jaubert GF. 1926. Origin of the colour of beeswax and the composition of propolis. *J. C. r. hebd.*, 184: 1134-1136.

Jin UH, *et al.* 2005. Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: isolation and identification. *Clin. Chim. Acta.*; 362(1-2):57-64.

Kimoto T, *et al.* 1998. Apoptosis and suppression of tumor growth by artemillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect. Prev.*, 22(6), 506-15.

Kimoto T, *et al.* 2001a. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemillin C. *Virchows Arch.*, 438(3), 259-70.

- Kimoto T, *et al.* 2001b. Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepellin C, an active ingredient of Brazilian propolis. *Anticancer Res.*, 21,221-8.
- Krol W, *et al.* 1990. Anti-oxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. *Biochemistry International*, 21(4), 593-598.
- Kustenmacher. 1911. Propolis. *Ber. Dt. Pharm. Ges.* 21: 65-92
- Lamberti L, *et al.* 1983. Cell kinetics and sister-chromatid-exchange frequency in human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 120, 193-199.
- Lavie P. 1960. Les substances antibacteriennes dans la colonie d'abeilles (*Apis mellifica* L.). *Annls. Abeille* 3, 103-183, 201-305
EB, AA 761/63
- Lea DE, Catcheside DG. 1942. The mechanism of the induction by radiation of chromosome aberrations in *Tradescantia*, *J. Genet.* 44, 216-245
- Lee YJ, *et al.* 2000. Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. *Cancer Lett.* 153, 51-56.
- Littlefield LG, *et al.* 1988, Modulation of radiation-induced chromosome aberrations by DMSO, an OH radical scavenger. 1: Dose-response studies in human lymphocytes exposed to 220 kV X-rays. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*; 53(6):875-90.

- Littlefield LG, *et al.* 1993. Concentration dependent protection against X-ray-induced chromosome aberrations in human lymphocytes. *Radiat. Res.*, 133, 88-94.
- Lloyd DC, *et al.* 1975. The relationship between chromosome aberrations and low LET radiation dose to human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 28(1):75-90.
- Lloyd DC, Edwards AA. 1983. Chromosome aberrations in human lymphocytes: Effect of Radiation quality, dose and dose rate, *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man*. Edited by Ishihara T, Sasaki MS (Alan R. Liss, New York) p. 23-49.
- Lloyd DC, Edwards. 1984. The dose response relationship obtained at constant irradiation times for the induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by cobalt-60 gamma rays. *Radiat. Environ. Biophys.* 23(3):179-89.
- Luchnik NV. 1975. Do one-hit chromosome exchanges exist? Dose-response relation for irradiated human lymphocytes. *Radiat. Environ. Biophys.* 2;12(3):197-204.
- Marcucci MC, *et al.* 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26, 83-99.
- Matsuno T, *et al.* 1995. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. *Zeitschrift fuer Naturforschung Section C Biosciences*, 50(1-2), 93-97.

- Na HK, *et al.* 2000. Restoration of gap junctional intercellular communication by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in a ras-transformed rat liver epithelial cell line. *Cancer Lett.* 31;157:31-8.
- Natarajan AT and Obe G. 1983. Influence of DNA repair on radiation-induced chromosomal aberrations in human peripheral lymphocytes. T. Ishihara, M. S. Sasaki (Eds.), *Radiation-induced chromosome damage in man*. Liss, New York, 127-140.
- Natarajan K, *et al.* 1996. CAPE is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa-B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(17), 9090-9095.
- Nowell PC. 1960. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20:462-6.
- Orsolic N, Basic I. 2005. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). *Biomed. Pharmacother.* 59(10):561-70.
- Padmavathi R, *et al.* 2006. Therapeutic effect of paclitaxel and propolis on lipid peroxidation and antioxidant system in 7,12 dimethyl benz(a)anthracene-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats. *Life Sci.* 8;78(24):2820-5.
- Papworth DG. 1975. Curve fitting by maximum likelihood. *Radial. Bot.*, 15, 127-140.
- Perry P and Wolff S. 1974. New Giemsa Method for differential staining of sister chromatids. *Nature.* 261, 156-158.

- Popravko *et al.* 1969. Flavonoid component of propolis. *Khimlya Prir. Soedin.* 5 (6) AA393/75
- Preston RJ. 1990. Biological dosimetry mechanistic concepts, Reunion International sobre dosimetría biológica, Madrid, 21-34.
- Rao CV, *et al.* 1992. Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. *Chemico-Biological Interactions*, 84(3), 277-290.
- Revell SH. 1955. A new hypothesis for "chromatid" changes. Z. M. Bacq, P. Alexander (Eds.), *Proc. Radiobiology Symposium*, Liege, Butterworth, London, 243-253.
- Rojas E, *et al.* 1993. Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anticancer Drugs*, 4, 637-640.
- Romashkova JA, *et al.* NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*. 2;401(6748):86-90.
- Roots S and Okada S. 1972. Protection of DNA molecules of cultured mammalian cells from radiation-induced single-strand scissions by various alcohols and SH compounds. *Int. J. Radiat. Biol.*, 21, 339-342.
- Sachs RK, Hlatky LR and Trask BJ. 2000. Radiation-produced chromosome aberrations. *Trends Genet.* 16,143-146.

- Sasaki MS, *et al.* 1977. Free radical scavenging in protection of human lymphocytes against chromosome aberration formation. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, 32, 439-445.
- Savage JRK. 1998. A brief survey of aberration origin theories. *Mutat. Res.* 404, 139-147.
- Savage JRK. 1999. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. MRC Radiation and Genome Stability Unit, Harwell, Didcot, OX11 0RD, UK
- Sax K. 1938. Chromosome aberrations induced by X-rays. *Genetics* 23, 494-516.
- Scheller S, *et al.* 1988. The ability of ethanolic extract of propolis (EEP) to protect mice against gamma irradiation. *Z. Naturforsch.* 44c, 1049-1052.
- Scifo C, *et al.* 2004. Resveratrol and propolis as necrosis or apoptosis inducers in human prostate carcinoma cells. *Oncol. Res.*, 14, 415-426.
- Shcherbakova P V, *et al.* 2003. Functions of eukaryotic DNA polymerases. *Sci. Aging Knowledge Environ.* 8, 1-11.
- Shiloh Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Rev. Cancer*, 3, 155-168.
- Shimizu K, *et al.* 2005. Artepillin C in Brazilian propolis induces G(0)/G(1) arrest via stimulation of Cip1/p21 expression in human colon cancer cells. *Mol. Carcinog.* 44(4):293-9.

Song YS, *et al.* 2002. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. *J. Ethnopharmacol*, 82 (2-3), 89-95.

Spencer CM and Goa KL. 1995. Amifostine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential as a radioprotector and cytotoxic chemoprotector. *Drugs*. 50, 1001-1031.

Stenstrand K, *et al.*, 1979. Radiation induced chromosome aberrations in human lymphocytes. STL-A29. Helsinki Institute of Radiation Protection.

Su ZZ, *et al.* 1994. Growth suppression and toxicity induced by CAPE in type 5 adenovirus-transformed rat embryo cells correlates directly with transformation progression. *Cancer Research*, 54(7), 1865-1870.

Takahashi E, *et al.* 1982. Radiation-induced chromosome aberrations in lymphocytes from man and crab-eating monkey. The dose-response relationships at low doses. *Mutat. Res.* 94(1):115-23.

Takata M, *et al.* 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBOJ.* 17, 5497-5508.

Upton AC. 1982. The biological effects of low-level ionizing radiation. *Sci. Am.* 246, 41-49

-
- Vijayalaxmi, *et al.* 1995. Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation-induced chromosome damage. *Mutat. Res.* 346(1):23-31.
- Volpert R, *et al.* 1993. Biochemical activities of propolis extracts. I. Standardization and antioxidative properties of ethanolic and aqueous derivatives. *Z Naturforsch [C]*. Nov-Dec;48(11-12):851-7.
- Volpert R, *et al.* 1996. Interactions of different extracts of propolis with leukocytes and leukocytes enzymes. *Arzneimittel-Forschung*, 46(1), 47-51.
- Ward JF. 1995. Radiation mutagenesis: the initial DNA lesions responsible. *Radiat. Res.* 142,362-368.
- Watabe M, *et al.* 2004. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NFkappaB and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.* 13;279(7):6017-26.
- Weng MS, *et al.* 2005. Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem. Pharmacol.* 15; 69:1815-27.
- Woo KJ, *et al.* 2004. Chrysin-induced apoptosis is mediated through caspase activation and Akt inactivation in U937 leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24;325(4):1215-22.
- Zheng ZS, *et al.* 1995. Caffeic acid phenethyl ester inhibits proliferation of human keratinocytes and interferes with the EGF regulation of ornithine decarboxylase. *Oncol Res.* 1995;7: 445-52.

